

المدخل إلى

علم الأحياء الدقيقة التشخيصي

www.IQRAHLAMONTADA.COM
An Introduction To
Diagnostic Microbiology

تأليف

إبراهيم علي الطيار

التدقيق اللغوي

أ. علي محمود الطيار

الطبعة الأولى

2003م - 1423هـ

منتدى إقرأ الثقافي

منتدى إقرأ الثقافي



دار صفاء للنشر والتوزيع - عمان

بۆدابهزاندنى جۆرمها كۆتیب: سەردانى: (مُنْتَدَى إِقْرَأَ الثَّقَافِي)

لتحميل أنواع الكتب راجع: (مُنْتَدَى إِقْرَأَ الثَّقَافِي)

پەراي دانلود كۆتایهای مختلف مراجعه: (منتدى اقرا الثقافى)

www.iqra.ahlamontada.com



www.iqra.ahlamontada.com

للكتب (كوردى ، عربى ، فارسى)



﴿ وَقُلْ أَعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ ﴾

صدق الله العظيم

المداخل إلى

علم الأحياء الدقيقة التشخيصي

An Introduction To
Diagnostic Microbiology

رقم الايداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (2002/10/2472)

576

طي

الطيار، إبراهيم علي
المدخل علم الأحياء الدقيقة التشخيصي - An
Introduction to Diagnostic Microbiology / إبراهيم
علي الطيار - عمان : دار صفاء للنشر ، 2002
() ص

ر . أ (2002/10/2472)
الواصفات : المختبرات // التحليل المخبري // علم
الأحياء الدقيقة /

* - تم اعداد بيانات الفهرسة الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

حقوق الطبع محفوظة للناسر

Copyright ©
All rights reserves

الطبعة الأولى

2003 م - 1423 هـ



دار صفاء للنشر والتوزيع

عمان - شارع السلط - مجمع الفحيص التجاري - هاتف وفاكس 4612190

ص.ب 922762 عمان - الاردن

DAR SAFA Publishing - Distributing

Telefax: 4612190 P.O.Box: 922762 Amman - Jordan

<http://www.darsafa.com>

E-mail : safa@darsafa.com

ردمك 0 - 073 - 24 - 9957 - ISBN

المقدمة

إن الزيادة السريعة في المعرفة الانسانية أدت إلى إتساع وتفرع العديد من العلوم وظهور علوم أخرى، وكغيره من العلوم تفرع علم الأحياء وظهر فرع العلوم الطبية المخبرية الذي ينضوي تحته العديد من العلوم الخاصة بالتشخيص المخبري للأمراض البشرية، ومع التقدم المتزايد علمياً أصبحت العلوم الطبية المخبرية مجتمعةً علماً منفرداً له خصوصيته وأهدافه، وما علم الأحياء الدقيقة التشخيصي سوى أحد فروع العلوم المخبرية ذي الأهمية الكبرى في تشخيص مسببات الالتهابات وأنواعها للوصول الى العلاج المناسب للمرض الجرثومي.

ويعتمد هذا العلم بالأساس على علم الأحياء الدقيقة الطبي كقاعدة له، إلا أن الأول يتميز بتخصصه في تشخيص مسببات الالتهابات ابتداءً من كيفية الحصول على العينة من المريض وحتى الوصول إلى المسبب وإيجاد العلاج المناسب له أيضاً. ولأهمية هذا العلم لطلبة تخصص المختبرات الطبية كأحد العلوم الطبية المساندة، ونظراً لندرة المراجع التي تتناول هذا الموضوع باللغة العربية تم وضع هذا الكتاب ليشمل أهم مواضيع علم الأحياء الدقيقة التشخيصي، ويغطي خطة جامعة البلقاء التطبيقية الخاصة بهذا الموضوع ويقدم مادة علمية بسيطة ومفيدة لطلبة المختبرات الطبية في كليتنا الجامعية المتوسطة، راجياً من الله أن أكون قد وفقت في ذلك .

والله ولي التوفيق

المؤلف

2002/10/1

المحتوى

الموضوع الصفحة

الوحدة الأولى

العينات

- الباب الأول: إجراءات السلامة العامة في مختبر الأحياء الدقيقة 13
- الباب الثاني: الطرق العامة في التشخيص المخبري للأحياء الدقيقة 15
- الباب الثالث: القواعد العامة لجمع العينات 27
- الباب الرابع: طرق حفظ العينات لحين زراعتها 31
- الباب الخامس: الساكن الطبيعي في جسم الإنسان 33

الوحدة الثانية

دراسة العينات المرضية

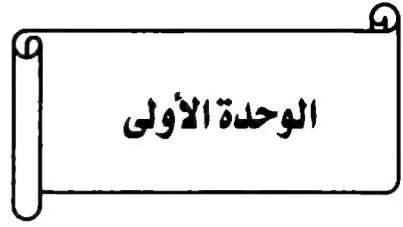
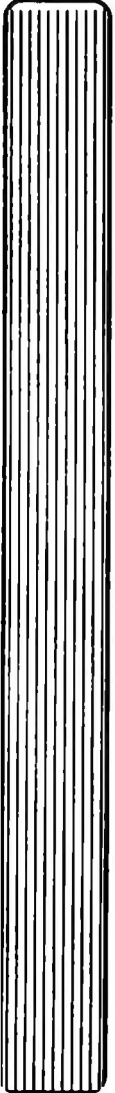
- الباب الأول: التهابات المسالك البولية 38
- الباب الثاني: التهابات الأمعاء 60
- الباب الثالث: التهابات الجهاز التناسلي 76
- إلتهابات الجهاز التنفسي 86
- الباب الرابع: التهابات الجهاز التنفسي العلوي 89
- الباب الخامس: التهابات الجهاز التنفسي السفلي 98
- الباب السادس: السائل النخاعي الشوكي (إلتهاب السحايا) 105
- الباب السابع: زراعة الدم 117
- لباب الثامن: مسحات العين 134

الباب التاسع:مسحات الأذن	142
الباب العاشر:مسحات الجروح والحروق	146
الباب الحادي عشر:سوائل الجسم.....	151

الوحدة الثالثة

الملاحق

1-فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية.....	159
2-أهم الأوساط المستخدمة في تنمية البكتيريا	164
3-مخطط للتفريق بين أهم أنواع المكورات الموجبة لصبغة غرام.....	165
4-مخطط للتفريق بين أهم العصويات السالبة لصبغة غرام	166
5-مخطط للتفريق بين أنواع العصويات الموجبة لصبغة غرام	167
6-المناطق الجسمية المعقمة وغير المعقمة	168
7-جدول يوضح الأوساط الزراعية والفحوصات المخبرية لكل عينة مرضية .	169



العينات

The Specimens

العينات The specimens

مقدمة :-

علم التشخيص Diagnosis هو أحد فروع علم الأحياء الدقيقة ويعرف على أنه:

مجموعة الطرق المستخدمة في التعرف على الكائن الحي الدقيق الموجود في العينة أو المسبب للمرض .من حيث اختيار العينة وطرق عزل الكائن الدقيق الموجود فيها أو المسبب للمرض ودراسة الخواص الشكلية و التركيبية المميزة له. ونتيجة للتعدد الكبير في أنواع الكائنات الحية الدقيقة من بكتيريا و فيروسات وفطريات وغيرها ، واختلاف صفاتها كان من الصعب التمييز بينها ولكن منذ اكتشاف المجهر الضوئي على يد العالم الهولندي لو فينهوك Leeuwen hook تم إثبات وجود الكائنات الحية الدقيقة في البيئات المختلفة .

وتبع ذلك جهود عدة علماء أهمهم روبرت كوخ R.koch الذي اكتشف علاقة البكتيريا بالمرض وقام بإيجاد تقنية الحصول على مزارع نقية للبكتيريا Pure culture، ثم تضافرت جهود العلماء ليتم الكشف عن أنواع كثيرة جداً من الأحياء الدقيقة الممرضة وغير الممرضة ودراسة صفاتها وأشكالها .

وتطور تبعاً لذلك علم التشخيص الذي أصبح علماً منفصلاً عن باقي فروع علم الأحياء بحيث ظهرت تقنيات علة ومتطورة تؤدي إلى التمييز الدقيق بين كل نوع وآخر من أنواع الأحياء الدقيقة اعتماداً على صفات ذلك الكائن المكتشفة أصلاً.

وقد أصبح بالإمكان التمييز بين الأنواع المرضية Pathogenic وغير المرضية Non Pathogenic و الانتهازية Opportunistic وأصبح من السهل تمييز الساكن

الطبيعي Normal flora في الجسم عن الأنواع الطارئة عليه و التي قد تكون سبباً
لحالة مرضية معينة .

وتتم عملية التشخيص في مختبر الأحياء الدقيقة الذي يجب أن يكون مزوداً
بالتجهيزات اللازمة لهذه العملية وتتوفر فيه مقومات السلامة العامة لتلافي العدوى
وانتقال الأمراض كما يجب أن يكون الفني أو الشخص الذي يقوم بعملية
التشخيص ذا كفاءة عالية ومعلومات غنية تمكنه من القيام بعملية التشخيص بجودة
عالية وشكل جيد.

الباب الأول

إجراءات السلامة العامة في مختبر الأحياء الدقيقة

Microbiological Lab. safety

قبل دراسة طرق تشخيص الأحياء الدقيقة يجب التعرف إلى بعض إجراءات السلامة العامة اللازم اتباعها في مختبر الأحياء الدقيقة. وذلك لمنع انتقال العدوى إلى العاملين أو إلى البيئة المحيطة وأهم هذه الإجراءات هي:

1. يمنع تناول أو حفظ الطعام أو الشراب أو التدخين داخل المختبر .
2. لمنع تلوث الملابس يجب ارتداء Lab. coat وإغلاقه واستخدام القفازات المطاطية عند العمل .
3. غسل اليدين بالماء و الصابون وتعقيمها بالكحول بشكل مستمر .
4. عدم لمس العيون أو الفم أو الأنف أثناء العمل .
5. قبل البدء بالعمل يجب أن يتم تعقيم مكان العمل بالكحول 70% ويفضل القيام بعملية الزراعة في خزانة السلامة safety cabinate لتلافي التلوث Contamination.
6. المحافظة على مكان العمل نظيفاً و معقماً وتجنب ازدحامه بالعينات و الأجهزة.
7. اخذ الحذر عند التعامل مع العينات المرضية أو الأدوات الحادة مثل الإبر والسرنج والواخزة Lancet.
8. يجب المحافظة على الأوعية المحتوية على العينات مغلقة بشكل جيد وعدم فتحها إلا في حيز معقم أو بجانب هب.
9. وضع المواد الملوثة أو المزارع القديمة في أوعية خاصة تمهيداً للتخلص منها وإتلافها في جهاز Autoclave.

10. التعقيم المباشر للأدوات المخبرية المستخدمة قبل وبعد كل استعمال مثلاً تعقيم Loop باللهب وتعقيم الماصات بالكحول أو محلول هيوكلورات الصوديوم 10% Na - hypochlorite.

11. يجب عدم استخدام الماصات Pipettes الفموية لنقل المزارع البكتيرية وفي حالة عدم توفر الماصات الأتوماتيكية Automatic pipettes يستحسن وضع كمية من القطن في النهاية العريضة للماصة قبل استخدامها .

12. عند حدوث تلوث للملابس أو الجلد أو أسطح العمل بالبكتيريا أو العينات المرضية يستخدم الكحول 70% أو محلول 10% هيوكلورات الصوديوم للتعقيم المباشر .

13. تحصين أجسام العاملين في مختبرات الأحياء الدقيقة بالطاعيم اللازمة مثل مطعموم التهاب الكبد الفيروسي Hepatitis B.virus أو مطعموم الايدز AIDS أو مطعموم السل T.B لتلافي انتقال العدوى لهم.

14. المحافظة علي ظروف التعقيم بشكل عام ومستمر عند التعامل مع أية عينة مرضية أو مزرعة جرثومية .

15. في حالة حصول حادث في المختبر أو سقوط المزارع الحية أو العينات المرضية يجب اتباع ما يلي:

(أ) إخبار مشرف المختبر بسرعة عن الحادث.

(ب) وضع منشفة ورقية فوق المادة المسكوبة .

(ج) سكب أي مادة مطهرة Disinfectant بكمية كافية فوق المنشفة الورقية .

(د) رفع المنشفة بعد مرور حوالي 15 دقيقة وإتلافها بشكل جيد.

16. يجب التعامل مع العينات المرسلة إلى مختبر الأحياء الدقيقة على أنها عينات مرضية من المفروض الحذر واتباع الإجراءات السليمة في التعامل معها ومراعاة ظروف التعقيم و السلامة في كافة مراحل العمل من اجل منع التلوث وانتقال العدوى و الخروج بنتائج سليمة وصحيحة بعد إجراء الفحوصات اللازمة على العينة .

الباب الثاني

الطرق العامة في التشخيص المخبري للأحياء الدقيقة

Laboratory Diagnosis of microorganisms

يتمثل التشخيص بعدة خطوات متسلسلة يعطي كل منها دليلاً معيناً على وجود الكائن من أجل الوصول إلى تحديد العامل المسبب للمرض والمساعدة في إعطاء العلاج اللازم لذلك، ويعتمد التشخيص بشكل أساسي على التعرف إلى:

1 - شكل الكائن الحي الدقيق وصفاته التركيبية .

2 - شكل النمو (المزرعة) وصفاته.

3 - التفاعلات البيوكيميائية والمصلية .

وتقسم طرق تشخيص الأحياء الدقيقة بشكل عام إلى أربع مراحل هامة وهي:

المرحلة الأولى: الفحص المجهرى للعينة المرضية

Microscopic examination of patient specimens:

حيث تعطي هذه المرحلة معلومات مهمة ومفيدة خلال أربع ساعات من وصول العينة إلى المختبر إذ يتم هنا التعرف إلى شكل الكائن الدقيق وبعض صفاته وتتمثل هذه المرحلة بعدة خطوات وتقنيات مهمة يفيد كل منها لتشخيص نوع أو أكثر من الأحياء الدقيقة وهي كما يلي:

1- الفحص المباشر للعينة Direct examination

ويتم ذلك إما بالتحضير الرطب Wet mount لمشاهدة الكائن المسبب وبعض الدلائل الأخرى على الالتهاب مثل الخلايا القحيحة Pus cells مثلاً أو بتقنية القطرة المعلقة Hanging drop Technique حيث يتم تمييز البكتيريا المتحركة عن غير المتحركة في العينة.

2- تقنية الصبغ Staining ،

تتميز هذه الطريقة بأنها سريعة وسهلة العمل وتلخص بوضع العينة على شريحة زجاجية وتجفيفها ثم إجراء خطوات الصبغ عليها ومن ثم مشاهدتها تحت المجهر ، و تعتبر هذه التقنية مفيدة فيما يلي:

- 1- التعرف على شكل الكائن الحي الدقيق.
 - 2- التعرف على تركيب الكائن الحي الدقيق.
 - 3- التعرف على تفاعله مع صبغة غرام (موجب أو سالب لصبغة غرام).
- واكثر الصبغات شيوعاً في العالم هي :

أ- **الصبغات الشائعة Common stains** : والتي تقسم إلى صبغات بسيطة وصبغات مركبة ومن الأمثلة على الصبغات شائعة الاستخدام ما يلي:

صبغة غرام Gram stain و صبغة اليود Iodine stain

وصبغة Acid-fast stains و صبغة جيما Giemsa stain

2-الصبغات التألقية (fluorochromes) Fluorescent dyes :

تعطى هذه الصبغات مظهراً متألّقاً للكائن الحي مع خلفية مظلمة عند الفحص بالمجهر التآلقي Fluorscent microscope بعد تحضير مسحة من العينة مباشرة وصبغها بالصبغات التآلقي . وتعتبر هذه التقنية مفيدة للتعرف السريع على الفطريات أو البكتيريا الموجودة في العينة المرضية و تميز الكائن الحي الدقيق عن خلايا الجسم و البقايا العضوية الأخرى .

واهم الصبغات التآلقي المستخدمة هي:

أ - صبغة Acridine orange التي ترتبط مع الحامض النووي للبكتيريا و الفطريات.

ب- صبغة Auramine rhodamine التي ترتبط مع الحامض Mycolic acid الموجود في الجدار الخلوي لبكتيريا Mycobacterium .

ج- صبغة Calcoflour white ترتبط مع السليلوز المكون لجدار خلية الفطريات .

3- فحوصات الحقل المظلم Dark Field Examination :

تستخدم هذه التقنية للكشف عن اللولبيات Spirochetes حيث يستعمل هنا مكثف Condenser خاص يوجه الضوء على العينة من زوايا مائلة جدا بحيث لا ينفذ الضوء مباشرة من خلال العينة وإنما تنعكس الأشعة الضوئية عنها لذلك فالضوء المنعكس عن العينة هو الضوء الوحيد المنتقل إلى الأعلى نحو المجهر .

وإذا ما نظم الضوء جيدا فإن العينة تظهر بوضوح و لمعان على أرضية معتمة كما ويمكن استعمال هذه الطريقة مع الأشعة فوق البنفسجية ultraviolet .

4- الفحوصات التألقيّة المناعية المباشرة Direct Immunofluorescence assay

تستخدم هذه الطريقة بشكل شائع للكشف عن بكتيريا Legionella Pneumophila و Bordetella Pertussis في عينات الجهاز التنفسي و الكلاميديا chlamydia Trachomatis في عينات ملتحمة العين و الجهاز التناسلي و تستخدم أيضا للكشف عن الفيروسات المختلفة .

و تلخص آلية هذه التقنية في إلصاق أصباغ متألقة مثل الفلوروسين Fluorescein مع أجسام مضادة Antibody دون أن تؤثر الصبغة على قابلية الأجسام المضادة في التفاعل مع الانتجينات Antigene و إذا ما التصق جسم مضاد معالج بصبغة الفلوروسين Fluorescein مع انتجين معين خاص على سطح الجرثومة . فإن الفلوروسين سيرتبط بسطح الجرثومة ويظهر على الكائن الحي بشكل حدود لامعة عند فحصه بالأشعة فوق البنفسجية (U.V) و يمكن بمساعدة هذه التقنية تحديد الأنواع المصلية Serotypes المتباينة للجراثيم عند الفحص المباشر للعينات .

المرحلة الثانية: الكشف عن جزيئات خاصة بالكائن المسبب للمرض

Detection of Pathogen –specific macromolecules

أ- الكشف عن انتجينات البكتيريا ، Detection of bacterial antigens

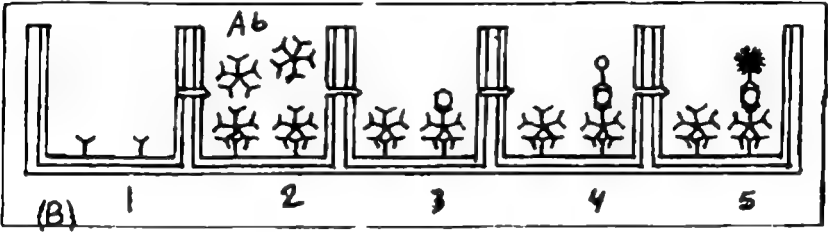
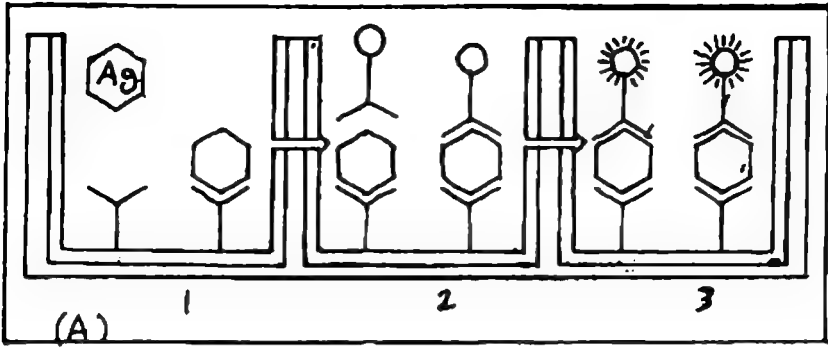
و تتميز الطرق التالية بالسرعة و الدقة و السهولة أكثر من الطرق التآلقيّة المناعية السابقة وهي :

1- طرق الفحص المناعي الأنزيمي (EIA) Enzyme Immunoassay :

إن معظم طرق (EIA) تستخدم أجساما مضادة مرتبطة مع سطح صلب (مثل الأغشية و الأطباق الرقيقة Microtiter plate) لأجراء التجربة من اجل الارتباط بالانتجين (Ag) في العينات السائلة إذ أنه بعد ارتباط الانتجين بالأجسام المضادة الموجودة والمحصنة يتم إضافة أجسام مضادة معلمة بالإنزيمات Enzyme-labeled antibody متخصصة إلى المزيج ثم يتم إضافة المادة الأساس substrate الخاصة بالإنزيم من اجل إعطاء تفاعل مرئي نتيجة لذلك، الذي يمكنه مشاهدته بأجهزة خاصة .

وتكون هذه العملية ناجحة في حل كون الجسم المضاد المحضّر أصلا خاص بالانتجين المضاف و الذي يرتبط معه ولا يتم إزالته بعمليات الغسل المستمر .
بينما إذا كان الانتجين المضاف من نوع مغاير للجسم المضاد فإن الانتجين لا يلتصق بالجسم المضاد وبالتالي يتم إزالته بعمليات الغسل Washing وتكون النتيجة في هذه الحالة سلبية Negative .

ويمكن من خلال هذه الطريقة الكشف عن العديد من الجراثيم في العينات المباشرة . فمثلاً يمكن الكشف عن بكتيريا Streptococcal Pharyngitis في مسحة swab مأخوذة من الحلق خلال 5-10 دقائق وتصل دقة وحساسية هذا الفحص إلى 95% في مجمل الحالات كذلك يمكن الكشف عن الكلاميديا C.trachomatis وسموم بكتيريا clostridium difficile والعديد من الفيروسات حيث يمكن الحصول على النتيجة في خلال عشر دقائق إلى ثلاث ساعات من بدء التجربة.



A- الكشف المباشر عن الانتجينات بطريقة ELISA .

- 1- إضافة العينة (مصل الدم) إلى أجسام مضادة خاصة ملتصقة بسطح صلب.
- 2- إضافة أجسام مضادة معلّمة بالإنزيمات متخصصة بالانتجين المراد الكشف عنه.

3- إضافة المادة الأساس Substrate لينتج التفاعل اللوني.

B- الكشف عن الأجسام المضادة (IgM) بطريقة ELISA .

1- أجسام مضادة خاصة بالنوع IgM ملتصقة بسطح صلب.

2- إضافة العينة المحتوية على IgM.

3- إضافة الانتجينات الخاصة بهذا الجسم المضاد.

4+5 : كما في الخطوات (2+3) من الفرع (A).

2- طريقة التآثر Particle agglutination .

وتتلخص هذه الطريقة بتأثير جزيئات كبيرة Latex مغطاة بأجسام مضادة خاصة بنوع معين من الأنتيجينات ثم خلطها مع العينة المحتوية على الأنتجين وعند وجود الأنتجين الخاص بالأجسام المضادة المخضرة فإن النتيجة الإيجابية تكون على شكل تآثر agglutination وتجمع للمزيج على شكل حبيبات صغيرة والذي يطلق عليه أيضاً اسم latex agglutination .

إذ تكون المنطقة (FC) من الجسم المضاد IgG هي المربوطة مع الجزيئات الكبيرة latex أو مع بروتين A لبكتيريا Staphylococcus aureus بينما تكون المنطقة (Fab) حرة قادرة على الارتباط مع النوع الخاص بها من الأنتيجينات .

ومن الأمثلة المهمة على هذا النوع من التقنية الطقم (Kit) المخضر الجاهز لتشخيص التهاب السحايا البكتيري حيث يحتوي هذا الطقم (Kit) على خمس عبوات كل واحدة تحتوي على أجسام مضادة خاصة بواحدة من الخمسة أنواع الشائعة للبكتيريا المسببة للسحايا بحيث تكون الأجسام المضادة ملتصقة على جزيئات Latex ويتم التفاعل بخلط نقطة واحدة من السائل النخاعي الشوكي CSF مع نقطة من كل عبوة ويكون حدوث التآثر بعد التحريك دليلاً على وجود أنتجين البكتيريا في CSF وتستخدم هذه التقنية في كثير من الفحوصات مثل فحص CRP وفحص الروماتيزم RA-Latex وفحص ASOT وغيرها من فحوصات التآثر.

ب- الكشف عن تسلسل الحامض النووي Detection of nucleic acid sequences

1- فحص الاستدلال على الحامض النووي للكائن الدقيق :

Nucleic acid probe test :

تستخدم هذه التقنية للكشف السريع عن البكتيريا في العينات المرضية أو مزارع الأحياء الدقيقة التي يشكل عزلها عملية معقدة مثل بكتيريا السيلان Neisseria gonorrhoeae و C.trachomatis .

وتبنى هذه التقنية على إن أي نوع من DNA يحمل شيفرة لتسلسل معين من

الجينات حيث يتم عزل DNA وتحطيمه على شكل خيط منفرد Single-strand
ليستخدم في إنتاج DNA مكمل (cDNA) Complementary DNA الذي
يستخدم كدليل Probe يتم الكشف من خلاله فيما بعد على rRNA في أية عينة
تحتوي على نفس الكائن الحي الدقيق الذي اخذ منه DNA الأصلي .

يستخدم جهاز خاص للقيام بهذا الفحص بيد أن ارتفاع سعر الجهاز والمواد
المستخدمة في الفحص تعتبر من سيئات هذه التقنية.

2- فحص PCR Polymerase chain reaction :

يستخدم هذا الفحص لتشخيص كثير من الأحياء الدقيقة في العينات
المرضية ويعتمد على تكثير DNA الكائن الدقيق الموجودة في العينة المرضية من
أجل إجراء الفحوصات اللازمة على DNA بسهولة. وتتلخص هذه التقنية
بالخطوات التالية:

أ- يتم عمل مزيج من المكونات التالية .:

1- ال DNA المراد التعرف عليه.

2- جين بدء Primers قادر على الارتباط بشريط ال DNA في نقطة معينة .

3- أنواع متعددة من النيوكليوتيدات Nucleotides.

4- أنزيم بلمرة مقاوم للحرارة Taq polymerase.

إذا أنه من الضروري لإضافة جينات البدء primers و النيوكليوتيدات
بكميات كبيرة إلى المزيج.

ب- يوضع المزيج في جهاز حراري خاص Thermocycler مجهز لتغيير درجة الحرارة
وتنظيم خطوات PCR الثلاث التالية.

1- يتم فصل ال DNA إلى شريط مفرد على درجة حرارة 90-95° م.

2- يبرد المزيج إلى درجة حرارة 50° م ليتم السماح لجين البدء بالارتباط في
موقعه المخصص على شريط DNA من أجل بدء إنتاج سلسلة مكمل

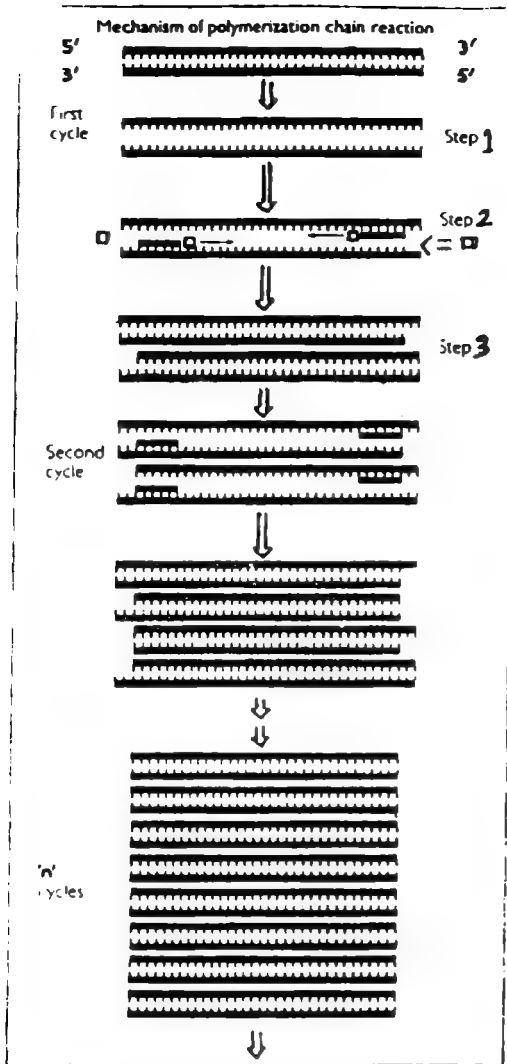
لشريط الـ DNA الأصلي المفرد.

3- يتم زيادة درجة الحرارة إلى 72°م بحيث يبدأ أنزيم البلمرة Taq

polymerase بإضافة النيوكليوتيدات إلى جن لتكون سلسلة DNA

مكملة ومقابلة للشريط الأصلي.

ج- تكرر هذه العملية لمرات متعددة لإنتاج ملايين النسخ من DNA الكائن الدقيق المراد تكثيره.



شكل مبسط لطريقة PCR

- 1- فصل سلسلتي الحامض النووي dsDNA.
- 2- إضافة النيوكلو تيدات وأنزيم البلمرة وجين البدء..
- 3- ترجمة DNA وإنتاج نسخ متعددة منه.

المرحلة الثالثة، زراعة وعزل الكائن الدقيق،

Cultural and Isolation of Microorganisms :

تعتبر عملية الزراعة من أهم الطرق المستخدمة لتشخيص الأحياء الدقيقة إذ يتم من خلالها تكثير الكائن الحي الموجود في العينة المرضية مما يسهل عزل ودراسة صفات هذا الكائن وتشكل مزارع الأحياء الدقيقة وسيلة مهمة تسهل وتعطي مجالاً واسعاً أمام الدارس لمتابعة الفحوصات على أي كائن حي دقيق ينمو في الأوساط الزراعية من حيث:

1- الصفات الشكلية للمستعمرات والنمو.

2- التفاعل مع الأجسام المضادة.

3- التفاعلات البيوكيميائية Biochemical test .

وتحتاج مزارع الأحياء الدقيقة لفترة زمنية من الحضانة على درجات حرارة مناسبة في الغالب تكون مقاربة لدرجة حرارة جسم الإنسان، وتتراوح الفترة الزمنية لحضانة المزارع من 18 ساعة إلى عدة أسابيع اعتماداً على نوع الكائن المراد الكشف عنه وسرعة انقسامه وطريقة تغذيته.

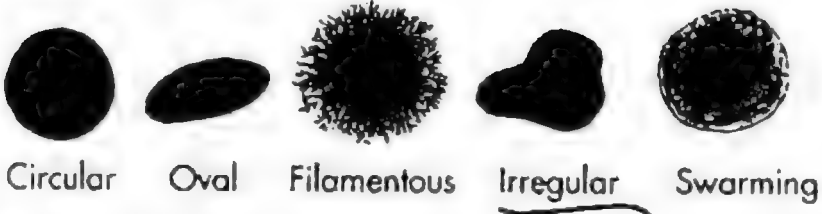
ويعتمد نجاح الكائن الحي في النمو على المزارع المغضرة على ما يلي:

1- طريقة جمع العينة من حيث مكان ووقت الجمع ومراعاة ظروف التعقيم أثناء ذلك.

2- اختيار الوسط الملائم للكائن المراد الكشف عنه مثلاً يوجد أوساط زراعية شاملة لتنمية عدة أنواع من البكتيريا مثل آجار الدم Blood agar و Chocolate agar بينما يوجد أنواع من الأوساط الزراعية خاصة بتنمية نوع أو أنواع قليلة من البكتيريا مثلاً وسط Lownstein - Jensen الخاص بتنمية بكتيريا السل Mycobacterium tuberculosis ووسط MacConkey agar الخاص بتنمية الأنواع البكتيرية السالبة لصبغة غرام.

وفي الاتجه الآخر هنالك أوساط زراعية خاصة لتنمية الفطريات مثل وسط SDA و أوساط خاصة لتنمية الفيروسات مثل المزارع التي تختلف في مكوناتها وصفات النمو على كل منها.

Shape/Margin (Top view)



Elevation (side view)



الصفات الشكلية لمستعمرات البكتيرية

المرحلة الرابعة، الفحوصات المصلية Serological test

تتركز هذه الفحوصات على أساس تفاعل الأجسام المضادة Antibody التي تونها الجسم نتيجة للإصابة بجراثومة معينة مع أنتيجينات Antigene عخررة في المختبر وخاصة بالجراثومة نفسها، إذ ترتفع الأجسام المضادة في جسم الإنسان تدريجياً بعد الإصابة بأية جراثومة وتكون هذه الأجسام المضادة بالنوع المسبب فقط لذلك فإن الفحوصات المصلية مفيدة للتشخيص المبكر للإصابات الجرثومية بشكل عام. لذلك يكون استخدام الفحوصات المصلية خاصة ذا أهمية كبيرة في الحالات التالية:

أ - صعوبة عزل الكائن المسبب للمرض مثلاً كما في الإصابات الناتجة عن الفيروسات أو المايكوبلازما.

ب - عمق مكان الإصابة مثل التهاب الرئة Pneumonia والتهاب العظام Osteomyelitis والتهاب الكبد.

ج - تحديد مرحلة الإصابة والتمييز بين الإصابة الحالية والإصابة القديمة Post infection.

ومن الأفضل كقاعدة لنجاح الفحوصات المصلية في عملية التشخيص أن تأخذ عيّتين من الدم الأولى خلال الطور الحاد للمرض Acute phase و الثانية بعد حوالي 2-3 أسابيع من الإصابة وذلك لزيادة فرص التشخيص السليم .

وتتضمن الفحوصات المصلية مجموعات متنوعة من الفحوصات منها .

1- فحوصات التخرثر agglutination test : تستخدم هذه الفحوصات لتشخيص الحمى المالطية و التيفوئيد وغيرها من الأمراض.

2- فحص تثبيت المكمل Complement fixation test : وأكثر ما يستخدم هذا الفحص لتشخيص الإصابات الفطرية والفيروسية وحمى Q (Q fever) التي تسببها بكتيريا Coxiella burneti .

3- الفحوصات التآلفية المناعية غير المباشرة Indirect immuno fluorscence tests : في هذه الطريقة تستخدم أجسام مضادة مرتبطة بمادة مشعة خاصة بنوع معين من الأجسام المضادة Anti-human antibody التي تتفاعل أصلا مع الأنتيجينات وتستخدم هذه الفحوصات للكشف عن البكتيريا المسببة لمرض الزهري Treponema و بكتيريا Borrelia و الركتسيا وغيرها من الأنواع.

الباب الثالث

القواعد العامة لجمع العينات

تعتمد نتائج المختبر التشخيصي بشكل كبير على نوعية العينة و الوقت وحالة المريض عند اخذ العينة و المواد المستخدمة وطريقة العمل بحيث تكون كل السابقة مناسبة لحالة المريض ولتنوع المرض و الكائن المسبب وتكون ذات كفاءة ودقة عالية .

ويعتبر جمع العينة المرضية أول واهم خطوة من خطوات تشخيص الإصابة و الكائن المسبب وذلك لان صحة الفحوصات التشخيصية للمرض و المسبب تعتمد بشكل أساسي على دقة عملية الجمع من حيث اختيار وقت وطريقة الجمع ومراعاة حساسية الكائن المراد الكشف عنه لبعض المواد الكيميائية وأماكن وجوده أثناء فترة الإصابة . لان عزل الكائن المسبب حياً من الأمور المهمة جداً في عملية التشخيص ومن الأمور المهمة أيضاً أثناء جمع العينة معرفة الساكن الطبيعي Normal flora لمنطقة اخذ العينة حتى لا يختلط التشخيص بين الكائن المسبب للمرض و الساكن الطبيعي لمكان أخذ العينة .

وتقع مسؤولية جمع العينة المرضية في الغالب على فني المختبر ولكن قد تتم هذه العملية في بعض الحالات خارج المختبر وهذا يستوجب التنسيق بين الطبيب و المرض و فني المختبر من اجل الحصول على عينة سليمة صالحة لعملية التشخيص. اما نوع العينة فيعتمد على أمور عدة منها الحالة المرضية ومرحلة المرض ونوع الكائن المسبب المراد البحث عنه وتختلف تبعاً لذلك أنواع العينات المستخدمة في تشخيص الالتهابات فهي قد تكون دم Blood أو بول Urine أو بلغم Sputum أو براز Stool أو قيح pus ومن اجل جمع افضل عينة مرضية يجب مراعاة الأمور التالية :

1- اختيار نوع العينة المراد جمعها بحيث تكون معبرة عن المرض ومفيدة في التشخيص وهذا يتطلب أموراً عدة منها :-

أ- معرفة جيدة بالحالة المرضية ومرحلة الإصابة ويكون ذلك بالتنسيق مع الطبيب فمثلاً يكون عدد الجراثيم كثيراً في المرحلة الحادة من الإصابة Acute phase ويكون عند الجراثيم أيضاً كبيراً في الإسهال أكثر من البراز الصلب أو اللين في حالات التهاب الأمعاء .

ب- المعرفة العامة بالكائن المتوقع عزله من أجل إعداد الأوساط وطرق العزل المناسبة له وكذلك من المفروض معرفة مكان وجود الكائن الدقيق في هذه المرحلة من الإصابة فمثلاً لتشخيص وعزل بكتيريا Salmonella المسببة للتيفوئيد تأخذ عينة البراز للزراعة بالفترة ما بين الأسبوع الثاني و الثالث من الإصابة.

ج- اخذ العينة المناسبة والصحيحة لتشخيص الحالة المرضية اعتماداً على الأعراض Symptoms و العلامات Signs ، مثلاً في حالة التهاب الرئة Pneumonia يتم أخذ عينة بلغم Sputum وليس اللعاب Saliva كذلك يجب اخذ المسحة Swab من عمق الجرح وليس من سطحه وفي حالة عدم وجود مكان مباشر لأخذ العينة يستعاض عن ذلك بزراعة الدم مثلاً أو بالفحوصات الأخرى كالفحوصات المصلية Serological test.

2- يجب أن تكون أوعية جمع العينات نظيفة ومعقمة ومحكمة الإغلاق ومميزة بمعلومات عن العينة و المريض .

3- يجب اخذ العينة من المريض قبل تناول المضادات الحيوية أو العوامل القاتلة للجراثيم Antimicrobial agents وفي حال تناول المريض لأي من المواد السابقة ، يجب التوقف عن أخذ العلاج و الانتظار مدة 3-5 أيام ثم أخذ العينة منه .

وفي حال كون زراعة العينة ضرورة مستعجلة في بعض الأوقات يتم اللجوء إلى إضافة مواد محللة للعلاجات مثل انزيم Penicillinase الذي يحطم البنسلين .

ويكون ذلك لأن تناول المضادات الحيوية يؤدي إلى اختفاء الجرثومة في العينة وإعطاء نتائج سلبية كاذبة فمثلاً لا تظهر الجراثيم في السائل النخاعي الشوكي CSF لمدة 24 ساعة بعد تناول المضادات الحيوية كما وتعطي زراعة البراز stool culture للكشف عن Salmonella نتيجة سلبية خلال 24 ساعة من تناول المضادات الحيوية أيضاً.

4- يجب تجنب التلوث الخارجي وذلك بمراعاة ظروف التعقيم كافة أثناء جمع أو حفظ أو نقل العينة كتعقيم الجلد الجيد قبل سحب الدم للزراعة مثلاً.

5- يجب أن تكون كمية العينة كافية ومناسبة للفحوصات المطلوبة .

6- عند توقع احتواء العينة على أعداد كبيرة من الساكن الطبيعي Normal flora يفضل وضع العينة في الثلاجة تحت درجة حرارة من 2-5م° لعدة ساعات من أجل تقليل الساكن الطبيعي الموجود فيها .

7- عند توقع وجود جراثيم لاهوائية في العينة يجب اخذ العينة ووضعها في أوعية خاصة مفرغة من الهواء وحماية على ثاني أكسيد الكربون CO2 أو إضافة مواد مختزلة للأكسجين إلى العينة .

8- الإسراع في نقل العينة إلى المختبر في حالة جمعها خارجة.

9- الإسراع في التعامل مع العينة من زراعة أو فحص أو حفظها في أوساط حفظ خاصة حتى يتم التعامل معها . فمثلاً يفضل فحص عينة إفرازات الاحليل للكشف عن جرثومة مرض السيلان N.gonorrhoeae مباشرة أو وضعها في وسط حافظ بسبب تلفها السريع و تأثرها بالبيئة المحيطة.

10- يجب أن تكون العينة مميزة برقم خاص أو باسم المريض ورقمه أن وجد ويكون نموذج طلب الفحص يحتوي على معلومات متعلقة بالمريض مثل الاسم والجنس والعمر ومعلومات متعلقة بالعينة مثل نوع العينة ومصدرها والفحص المطلوب ووقت أخذها.

11- يجب رفض العينة غير الصحيحة وغير المناسبة لشروط صحة الفحص مثل عدم توافق العينة مع المعلومات المدونة على الوعاء أو النموذج المرفق أو أن تكون جافة أو مفتوحة غير معقمة أو أية شروط تجعلها غير صالحة للفحص .

الباب الرابع

طرق حفظ العينات لحين زراعتها

كما أسلفنا سابقاً إن جمع العينة يعتبر الخطوة الأولى والمهمة في عملية التشخيص إلا أن هذا لا يقلل من قيمة الخطوات الأخرى في عملية التشخيص حيث تساعد هذه الخطوات مجتمعة في الوصول إلى نتائج سليمة وقيمة تؤدي في النهاية إلى تحديد الكائن المسبب للمرض ومن الخطوات المهمة التي تلي عملية جمع العينة هي عملية حفظ العينة حتى زراعتها ، إذ أنه في بعض الحالات يتعذر التعامل المباشر والسريع مع العينة المرضية لأسباب قد تكون خارجة عن إرادة العامل في المختبر مثل عدم توفير المواد اللازمة للفحص أو الحاجة إلى نقلها إلى مختبر آخر مما يستوجب توفير ظروف ملائمة للعينة حتى تبقى العينة في حالتها الطبيعية ويبقى الكائن الحي الدقيق فيها حياً دون أن يتأثر بالظروف الخارجية وتستخدم في هذه الحالة أوساط زراعية خاصة من أجل حفظ أو نقل العينة maintenance or transport media حتى تتوفر الظروف الملائمة لزراعتها، وأوساط الحفظ أو النقل هي أوساط غذائية تساهم في بقاء الكائن الحي في حالته الطبيعية وحيويته لفترات زمنية طويلة إلا أنها لا توفر النمو المثالي الجيد للكائن الحي الدقيق فيها . وتختلف هذه الأوساط اعتماداً على نوع الكائن الحي المتوقع وجودة في العينة المرضية.

ومن البديهي أن الهدف الرئيسي لزراعة العينات المرضية هو تكثير الكائن الحي الدقيق المتوقع وجوده فيها من أجل دراسته و التعرف على صفاته وحتى يتم ذلك لابد من أن يبقى هذا الكائن حياً في العينة محافظاً على حيويته فيها حتى ولو تأخرت عملية الزراعة ولأجل الحصول على نتائج سليمة لعملية حفظ العينات ونقلها حتى زراعتها يفضل اتباع القواعد التالية:

1- يفضل زراعة العينة مباشرة بعد أخذها من المريض على الوسط المناسب وفي ظروف مناسبة وهذا يعتبر أفضل طريقة للحصول على نتائج سليمة وخاصة

لبعض العينات التي لا تتحمل البقاء لمدة زمنية طويلة في الظروف البيئية المحيطة مثل عينات CSF أو إفرازات الأكليل للبحث عن البكتيريا المسببة للسيلان. إذا لم تتوفر الظروف المناسبة لزراعة العينة مباشرة فهناك وقت مسموح به لبقاء الكائن الحي الدقيق حياً في العينة على درجة حرارة الغرفة فمثلاً يفضل زراعة عينة البول خلال ساعة من جمعها بينما عينة البراز تأخذ فترة أكثر بقليل من عينة البول .

3- توضع العينات في الثلجة بين 2-8°م للمحافظة على حياة الكائن الحي الدقيق فيها لفترة زمنية تتراوح 3-24 ساعة حيث يتم تثبيط نمو و تكاثر الأحياء الدقيقة فيها لحين زراعتها وتنقل هذه العينات إلى مختبرات أخرى في صندوق مبرد Cooling box على أن تكون عملية الزراعة والنقل ضمن الفترة الزمنية المسموح بها والمحددة أعلاه .

4- بعض العينات يفضل أن تبقى في درجة حرارة الغرفة ولا توضع في الثلجة مثلاً لا ينصح بوضع عينات CSF و نخاع العظم Bone marrow و كشطات الجلد Skin scraping و الأظافر والشعر المستخدمة للكشف عن الفطريات الجلدية في الثلجة ، وإنما تبقى على درجة حرارة الغرفة حتى تتم زراعتها .

5- يفضل حفظ المسحات Swabs في أوساط سائلة مثل Thyoglycollate broth أو غمسها في الآجار الصلب .

6- في حال صعوبة زراعة العينة خلال الوقت المناسب و اللازم لبقاء الكائن حياً فيها يفضل وضعها في أوساط حفظ ونقل خاصة بكل عينة حتى يتم زراعتها أو وصولها إلى المختبر الخاص وذلك للحفاظ على الجراثيم من الجفاف أو الأكسدة أو التحطيم الذاتي ومن أكثر أوساط النقل المستخدمة وسط Cary-Blair media ووسط Amies ووسط Sturat ووسط ماء البيتون القاعدي Pepton water media .

7- أما العينات التي يتوقع وجود الفيروسات فيها فيتم حفظها في الثلج حتى تتم عملية الزراعة لها مع تجنب تجمدها على أكثر من -70°م أو توضع في أوساط حفظ ونقل خاصة تحتوي على المضادات الحيوية لمنع تكاثر البكتيريا فيها .

الباب الخامس

السكان الطبيعي في جسم الإنسان Normal flora

يعرف السكان الطبيعي على انه مجموعة الأحياء الدقيقة التي تعيش بشكل طبيعي على جلد الإنسان أو غشائه المخاطي وفي مناطق مختلفة من الجسم وقد يبلغ عدد البكتيريا التي تعتبر ساكناً طبيعياً في جسم الإنسان حوالي (10^{14}) خلية بكتيرية. وتمثل البكتيريا الجزء الأكبر من السكان الطبيعي في الجسم ويرافقها نسبة قليلة من الخمائر Yeast cell's مثل Candida spp أما الفيروسات و الطفيليات في الغالب فأنها كائنات مسببة للمرض إذا وجدت أي أنها من النادر أن تكون من السكان الطبيعي في جسم الإنسان ويلعب هذا السكان الطبيعي أدواراً عدة في جسم الإنسان منها :-

1- مقاومة الإصابة Infection resistance

إن وجودها السكان الطبيعي قد يساعد الجسم في مقاومة الإصابة بكثير من الأحياء الدقيقة المسببة للمرض من خلال منع ارتباط الكائن المسبب للمرض في مستقبلاته الموجودة على خلايا الجسم وإفراز بعض المواد التي تمنع حدوث المرض أو تقتل المسبب.

2- تنشيط جهاز المناعة Stimulation of the Immune system

تلعب معظم أنواع السكان الطبيعي (ما عدا البكتيريا العصوية السالبة لصبغة غرام) دوراً مهماً في حث مناعة الجسم وتنشيطها بسبب تشابه بعض انتيجيناتها مع بعض البكتيريا الممرضة.

3- مصدر غذائي Neutrient source

حيث تعمل على المساعدة في استخلاص وإنتاج بعض المواد الغذائية المفيدة للجسم مثل فيتامين K وتساعد أيضاً بتصنيع مواد مساعدة لإنتاج بعض عوامل التخثر مثل العامل الثاني II و السابع VII و العاشر X .

4- تساعد على تنشيط تجديد الخلايا الطلائية الموجودة في جسم الإنسان وتلعب هذه

الكائنات التي تعيش كساكن طبيعي في جسم الإنسان دوراً في إحداث بعض الأمراض للجسم وذلك من خلال ما يلي .:

أ- الإصابة الانتهازية Opportunistic infection :

إذ يعمل الساكن الطبيعي في بعض الحالات بشكل انتهازى ليحدث للجسم أمراضاً متعددة خاصة في حالات تدني المناعة الناتجة من أمراض مثل مرض AIDS أو تناول جرعات عالية من المضادات الحيوية أو لأي سبب قد يؤدي الى انخفاض مناعة الجسم .

ب- دخول الأنسجة Tissue invasion :

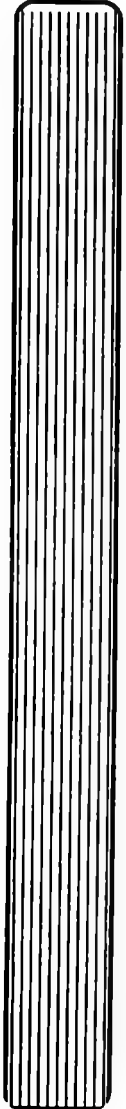
يحدث في بعض الأوقات اختراق الساكن الطبيعي للأنسجة الموجودة في مكانه الطبيعي نتيجة لحادث ما أو لتوفر الظروف المناسبة مثلاً عندما يدخل الساكن الطبيعي للجلد عن طريق الجروح فإنه يسبب التهاباً موضعياً للجرح .

ج- الانتقال من مكان إلى آخر في الجسم :

حيث ينتقل الساكن الطبيعي من موقعه الأصلي إلى أماكن مختلفة من الجسم عبر الدم أو اللمف أو بشكل خارجي فيسبب فيها إصابات مختلفة مثلاً تعتبر بكتيريا E.coli ساكناً طبيعياً في أمعاء الإنسان وعند انتقالها بأي الطرق إلى القناة البولية فإنها تسبب لها الالتهاب وتعتبر E.coli من أكثر مسببات التهابات المسالك البولية.

ويتوزع الساكن الطبيعي في جسم الإنسان بنسب و أنواع مختلفة حسب منطقة وجوده فمثلاً يوجد في الجلد حوالي $10^4 - 10^5$ كائن دقيق لكل سنتيمتر مربع واحد أغلبها من بكتيريا Staphylococcus epidermidis التي توجد في حوالي 85-100% من الأشخاص الطبيعيين بينما تمثل E.coli أعلى نسبة بين أنواع الساكن الطبيعي في أمعاء الإنسان ويعتمد وجود الساكن الطبيعي على توفر الظروف الملائمة له فهو يكثر على الجلد مثلاً في المناطق الرطبة و المتسخة بينما تكثر الأنواع اللاهوائية مثلاً في القناة الهضمية .

2



الوحدة الثانية

دراسات العينات المرضية

دراسة العينات المرضية

إن علم التشخيص كغيره من العلوم يتضمن عدة خطوات متسلسلة ومرتبعة تؤدي إلى الحصول على النتائج المطلوبة إذ يبدأ من جمع العينة إلى تشخيص الكائن المسبب للمرض ولكل خطوة أهميتها للحصول على نتائج سليمة وصحيحة يلزمها الدقة والتمكن في الجانب العملي والنظري ، فطريقة اختيار العينة والوقت والمكان وكيفية اخذ العينة وتناسب ذلك مع الحالة المرضية والكائن المتوقع وجودة بالإضافة إلى الدقة المتناهية في العمل جميعها عناصر مهمة في عملية التشخيص وبما أن العمل التشخيصي يتعرض إلى تداخلات عدة من تلوث وأخطاء ذاتية وغير ذاتية وعوامل أخرى قد تقلل من دقة عملية التشخيص أو تحولها في اتجاه آخر فلا بد من توخي الدقة المتناهية في كل الخطوات أثناء العمل .

وسنفرد لاحقاً تفصيلاً يخصص كل عينة مرضية وحدها من حيث طريقة جمعها و الكائنات الحية الدقيقة المتوقع وجودها فيها وطريقة تشخيص كل منها .

الباب الأول

التهابات المسالك البولية

Urinary Tract infection (UTI)

(Urine عينة البول)

مقدمة:

يعرف البول على انه سائل اصفر اللون حامضي معقم وخالي من الجراثيم في الوضع الطبيعي مكون من حوالي 96% ماء و 4% مواد صلبة ذائبة ذو كثافة نوعية بين 1.015 و 1.020 والرقم الهيدروجيني PH بين 6.5 - 7.5 و تختلف كميته اعتمادا على عوامل عدة في الجسم و ينتج من الجهاز البولي الذي يتكون في الإنسان من الكليتين و الحالبين و المثانة و الاحليل إذ يتعرض هذا الجهاز إلى التهابات متعددة تحدثها الأحياء الدقيقة وتعتبر التهابات القناة البولية (UTI) Urinary tract infection من أكثر الالتهابات شيوعاً في جسم الإنسان إذ تسمى الالتهابات التي تحدث اسفل الجهاز البولي وتشمل المثانة (bladder) ب Cystitis و تسمى التهابات الإحليل تسمى Urethritis أما التهابات أعلى الجهاز البولي و التي تشمل الكلى فتسمى Pyelonephritis.

ويعتبر التهابات اسفل الجهاز البولي من أكثر هذه الالتهابات شيوعاً إذ إن النوعين الآخرين هما مضاعفات للنوع الأول.

وتعتبر النساء أكثر عرضة للإصابة بالتهابات القناة البولية بثلاثين مرة من الرجال وذلك لأسباب تشريحية خاصة وتزداد احتمالية حدوث الإصابة مع تقدم العمر إذ أظهرت الدراسات أن 40% من النساء اللواتي تزيد أعمارهن عن 60 عاماً مصابات بالتهاب القناة البولية بينما عدد المصابين من الذكور والذين تزيد

أعمارهم عن 60 عاماً هو 60% فقط. وتعود اغلب التهابات القناة البولية للأسباب التالية :-

1- تلوث فتحة البول بالجراثيم الموجودة كساكن طبيعي في الأمعاء Fecal Normal flora أو الموجودة كساكن طبيعي على الجلد Skin Normal flora بحيث ترتد الجرثومة إلى الخلف بالتجمل القناة البولية لتحدث الالتهاب.

2- الاختلالات التشريحية Anatomic abnormalities للقناة البولية و التي تؤدي خاصة لانسداد مجرى البول أو ارتداد وعدم طرح البول كاملاً خارج الجسم .

3- العوامل الميكانيكية Mechanical Factors وهي العوامل التي تتضمن نقل الجراثيم إلى القناة البولية بصورة إجبارية مثل :-

أ- أنبوب القسطرة Catheters أو المسحات Swabs .

ب- المعاشرة الجنسية : إذ تكون المرأة المتزوجة و الحامل أكثر عرضة للإصابة من غيرها بالتهابات المسالك البولية .

ج- حصى الكلى Kidney stones وهي قد تؤدي إلى انسداد جزئي مجرى البول أو إحداث جروح أثناء نزولها من القناة البولية و بالتالي فتح المجال أمام حدوث الالتهاب بسهولة .

4- العوامل الايضية Metabolic Factors : مثل الإصابة بمرض السكري و الذي يؤدي إلى زيادة كمية السكر في البول مما يوفر بيئة مناسبة لنمو الجراثيم و تكاثرها حيث تزداد احتمالية الإصابة بالتهابات القناة البولية عند الأشخاص المصابين بالسكري أكثر بثلاثين مرة من الأشخاص السليمين . كذلك فإن بعض الاختلالات التي تؤدي إلى تكون حصى الكلى والتي تزيد بدورها من احتمالية حدوث التهابات القناة البولية

5- إصابات المستشفيات Hospital infection : يتعرض كثير من المرضى في المستشفيات إلى التهابات القناة البولية بواسطة جراثيم ذات مناعة متطورة للمضادات الحيوية وخاصة عند إجراء عملية القسطرة البولية Urethral

catheterization أو اخذ مسحات من القناة البولية أو عند إجراء عملية بزل البول من المثانة Aspiration بواسطة أدوات قليلة التعقيم .

ويسبب نوع واحد من الجراثيم في الغالب التهابات القناة البولية إلا أنه في بعض الحالات قد يكون المسبب عدة أنواع من الجراثيم وهذه حالة نادرة جداً وهناك أعراض سريرية وتخبريه قد تساعد في تشخيص التهابات القناة البولية مثل:-

أ- ترتبط التهابات اسفل الجهاز البولي Cystitis بالأعراض التالية:

1- البول المتكرر Frequency

2- عدم القدرة على التبول dysuria أو وجود ألم عند التبول .

3- نزول الدم مع البول Haematuria .

ب- وترتبط التهابات أعلى الجهاز البولي Pyelonephritis بالأعراض التالية :-

1 - القشعريرة Chills .

2 - الحمى Fever .

3 - حرقة وألم عند التبول على جانبي الجسم وقد ينزل إلى الأسفل باتجاه العانة .

ج- وتظهر أعراض مشتركة مثل ظهور الخلايا القيقحية Pus cell مع البول Pyuria و كذلك البكتيريا Bacteriuria .

ولتشخيص التهابات القناة البولية يعتبر البول من أهم العينات التي تأخذ لذلك فهو الوسط المهم للزراعة ودراسة المسببات المحتملة للالتهابات وإعطاء صورة عامة عن الجهاز البولي ويكون البول في العادة سائلاً معقماً sterile خالياً من الجراثيم وقد يتلوث البول أثناء نزوله من الجسم ببعض الجراثيم التي تعتبر ساكناً طبيعياً في الاحليل وخاصة الكميات الأولى من البول التي قد تحتوى على (10^1 - 10^3) من الجراثيم لكل مليلتر واحد من البول وقد يدل ظهور أحد أفراد البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae في أول دفعة من البول على وجود الالتهاب أو تلوث

العينة Contamination ولذلك يتم اللجوء إلى عد البكتيريا في العينة من اجل تميز البكتيريا الناتجة من الإصابة عن البكتيريا الناتجة من تلوث العينة .

ولقد أكدت العديد من الدراسات وخاصة التي قام بها العلماء مثل Kass و Sanford وغيرهم ، إن عينة البول إذا احتوى كل مليلتر واحد منها على عدد من البكتيريا اكثر من 100,000 (10^5 /ml) جرثومة أو ما يسمى وحدة تكوين المستعمرة Colonies forming unite (CFU/ml) فان ذلك دليل مهم على وجود الالتهاب البكتيري .

أما إذا كان العدد اقل من (10^5 CFU/ml) فان ذلك ليس دلالة أكيدة على وجود الالتهاب حيث إن البول الطبيعي قد يحتوي على عدد من الجراثيم الناتجة من تلوث العينة إلا انه في بعض الحالات قد يكون عدد البكتيريا في عينة البول اقل من (10^5 CFU/ml) ومع ذلك فان الالتهاب قد يكون موجوداً حفاً كما في الأشخاص الذين يتناولون بعض المضادات الحيوية و الأشخاص الذين تناولوا كميات كبيرة من السوائل التي أدت إلى تخفيف البول .

الجراثيم المحتمل وجودها في عينة البول

البكتيريا المرضية Pathogenic	السكان الطبيعي Normal flora
Escherichia coli	Diphtheroids
Klebsilla	Lactobacilli
Enterobacter	Coag-Negative staphylococci
Serratia	Alpha-streptococci
Proteus spp	وأعداد قليلة من
Pseudomonas spp	Enterobacteriaceae
Streptococcus Faecalis	Yeast
Staphylococcus (aureus -	
Saprophyticus - epidermadis)	
Alcaligenes spp	
Candida albicans	
Gardenella	

Beta-hemolytic Streptococci N.gonorrhoeae C.trachomatis Enterococcus Acinetobacter Mycobacterium spp T.vaginalis Schistosoma Salmonella Shigella	
---	--

ويمكن تقسيم مسببات التهابات المسالك البولية إلى :

1- المسببات الشائعة :

أ) تعتبر مجموعة البكتيريا المعوية Enterobacteriaceae من المسببات الشائعة لالتهابات المسالك البولية والتي تعتبر كساكن طبيعي في القناة الهضمية للإنسان وتسبب حوالي 80% من الحالات حيث تسبب بكتيريا E. coli حوالي 50% - 85% من الحالات بينما تسبب بكتيريا Klebsiella Pneumonia حوالي 3% - 8% وتعتبر Staph. Saprophyticas أيضاً من المسببات الشائعة لالتهابات المسالك البولية وخاصة عند النساء اليافعات كونها ساكناً طبيعياً على الجلد .

ب) البكتيريا الانتهازية Opportunistic Bacteria: مثل Pseudomonas, Serratia, Proteus وتسبب هذه الأنواع معظم إصابات المستشفيات Nosocomial infectins حيث يعتقد أنها ذات قابلية لمقاومة العوامل القاتلة للجراثيم .

2- المسببات غير الشائعة :

أ- البكتيريا مثل Staph.aureus , Lactobacilli .

ب- الفطريات مثل Candida .

ج- الفيروسات مثل 2 Adenovirus.

د- وباقي الأنواع المذكورة في الجدول السابق .

جمع العينات Collection of specimens

تجمع عينة البول Urine لتشخيص التهابات القناة البولية في الإنسان ولكن قبل البدء بعملية الجمع يجب اتباع ما يلي .:

أ- على المريض الامتناع عن تناول المضادات الحيوية لفترة 4-5 أيام قبل إعطاء العينة وذلك لتجنب النتائج السلبية الخاطئة حيث أن تناول المضادات الحيوية ولو بكميات قليلة فأنها تمنع نمو البكتيريا على أطباق الزراعة .

ب- جمع البول في عبوة Steriel Container معقمة جيداً وبحكمة الإغلاق ومناسبة الحجم .

ج- تنبيه المريض إلى عدم فتح العبوة لفترة زمنية طويلة وعدم ملامسة الجوانب الداخلية للعبوة وإغلاقها مباشرة بعد وضع العينة فيها .

ويتم جمع البول من المريض بعدة طرق هي:

1- تقنية البول الوسطي Midstream-clean-catch technique .

وهي أكثر الطرق شيوعاً لجمع عينة البول إذ إنها طريقة سهلة وتقلل عملية نمو العينة بالبكتيريا الموجودة في الاحليل Urethra والمهبل Vagina وتتلخص في طرح الكمية الأولى خارجاً ثم وضع الكمية التالية وسط البول Mid stream urine (MSU) في عبوة الجمع وطرح آخر البول خارج العبوة .
وتتم هذه العملية في الذكور بالطريقة التالية:

1- غسل اليدين.

2- غسل مقدمة القضيب Penis بالصابون.

3- غسل القضيب بالماء المعقم .

4- طرح الكمية الأولى من البول في خارج العبوة .

5- وضع كمية من وسط البول Midstream urine في العبوة ثم وإغلاقها جيداً.
أما عند الإناث فيتم جمع العينة بالطريقة التالية..

1- غسل اليدين.

2- مسح الفرج بأسفنجة مغموسة بالصابون من الأمام إلى الخلف ثم التخلص من الاسفنجة .

3- تكرار العملية السابقة ثلاثة مرات .

4- غسل الفرج بالماء المعقم .

5- التخلص من الجزء الاول من البول .

6- وضع ما تبقى من البول في عبوة معقمة وإغلاقها جيداً .

ملاحظة: يفضل اخذ عيتين من البول في الإناث بواسطة طريقة (MSU)
Midstream urine وذلك لإعطاء دقة في النتيجة تصل إلى 95% .

2- طريقة القسطرة Catheterization.

في بعض المرضى الموجودين في المستشفيات يتم إدخال أنبوب مطاطي يسمى Catheter إلى المثانة عبر الاحليل من اجل المساعدة في طرح البول خارج الجسم لتلافي حالات انحباس البول التي قد ينتج بعضها من التهابات المسالك البولية ويتم اخذ العينة عبر هذا الأنبوب Catheter بتعقيم الجزء الموجود خارج الجسم بالكحول وسحب البول منه بواسطة سرنج syringe معقم ثم وضع البول في عبوة معقمة مباشرة وإغلاقها جيداً.

ومن الجدير بالذكر انه يجب عدم اخذ عينة البول من كيس جمع البول drainage bag المتصل بأنبوب القسطرة حيث إن عدد البكتيريا الموجودة في البول المتجمع في الكيس يكون قد ازداد وتضاعف أثناء فترة التجميع وذلك لان البول يعتبر وسطاً مناسباً لتكاثر البكتيريا .

ويفضل اخذ عينة البول في النساء بطريقة القسطرة تجنباً لتلوث العينة بالبكتيريا الطبيعية الموجودة في منطقة الاحليل والفرج . ويعتقد إن عملية القسطرة

كما أسلفنا أحد مسببات التهابات المسالك البولية في المستشفيات إذ إن عملية تركيب هذه الأنابيب قد تدخل معها بعض البكتيريا التي قد تكون سبباً في حدوث الالتهابات .

3- طريقة السحب المباشر من المثانة البولية Suprapubic Needle Aspiration .

يلجأ الأطباء في بعض الحالات إلى هذه الطريقة من أجل الحصول على عينة من البول الموجود في المثانة باستخدام إبرة معقمة تدخل مباشرة في الجلد بعد تعقيمه إلى المثانة ثم يتم سحب البول ووضعه في وعاء معقم وتستخدم هذه الطريقة عند الأطفال الذين يصعب اخذ عينة البول منهم بشكل طبيعي أو في النساء لتجنب تلوث العينة ببكتيريا الاكليل أو الفرج .

4- يتم جمع البول عند الأطفال infants غير القادرين على التحكم بعملية التبول لديهم بواسطة تثبيت كيس خاص على الفتحة البولية ثم إغلاق الكيس ونقله مباشرة بعد عملية التبول إلى المختبر وبسرعة دون تأخير حتى لا يتم تكاثر البكتيريا في البول والذي قد تنتج عنه وإعطاء نتائج خاطئة في عملية الزراعة. أما الخطوات اللاحقة لعملية الجمع فهي :

1 - إرسال العينة إلى المختبر لتزرع مباشرة في مدة لا تزيد عن ساعتين مع بقاء العينة على درجة حرارة الغرفة 25م°.

2 - إذا تعذر زراعة العينة مباشرة توضع في الثلاجة على درجة حرارة 2-5 م° لمدة لا تزيد عن 24 ساعة ويفضل نقل عينة البول في صندوق مبرد Cooling box إلى مختبر آخر عند الحاجة.

3- ويمكن حفظ البول بإضافة وسط Becton-Dickinson كوسط حافظ لعينة البول مع بقاء العينة بدرجة حرارة الغرفة إذ أن هذه المدة تحافظ على البكتيريا الموجودة في البول لمدة 24 ساعة كذلك يمكن إضافة طبقة من مادة التولوين Toluene على سطح العينة وذلك كإجراء وقائي وحافظ للعينة إذ تمنع هذه الطبقة من ملاصقة الهواء لعينة البول وبالتالي منع التلوث الخارجي للعينة بحيث تستخدم هذه الطريقة لحفظ العينة لفترة زمنية قصيرة .

المراحل المتبعة في فحص البول جرثومياً:

الفحص الروتيني للبول والذي يتضمن :-

أ- الفحص الظاهري Macroscopic examination

ويتم بملاحظة اللون و العكورة ويستخدم حالياً شريط خاص يمكن من خلاله الاستدلال على وجود كريات الدم البيضاء و الحمراء و النترات Nitrite وغيرها.

ب- الفحص المجهرى Microscopic examination

يتم اخذ جزء من العينة (8-10) مل في ظروف معقمة ثم عمل طرد مركزي لهذا الجزء ودراسة الراسب تحت المجهر للملاحظة وجود كريات الدم البيضاء و الحمراء و الاسطوانات casts و البلورات crystals و البكتيريا وغيرها إذ يترافق التهاب المسالك البولية عادة بوجود عدد كبير من كريات الدم البيضاء القحيية Pus cells و البكتيريا مع العينة.

ويستخدم الفحص الروتيني للبول قبل عملية الزراعة من اجل :

1 - التأكد من وجود دلائل الالتهاب .

2 - التأكد من خلو البول من الطفيليات مثل الترياكومونس Trichomonas أو الفطريات Fungi التي تعتبر أيضاً من مسببات التهاب المسالك البولية.

2- زراعة البول Urine-Culture

كما أسلفنا تستخدم عملية الزراعة لتحديد النوع البكتيري المسبب

للالتهاب يفضل قبل عملية الزراعة الأخذ بما يلي :-

1- أعداد الأوساط اللازمة والمناسبة للبكتريا المتوقع وجودها في العينة .

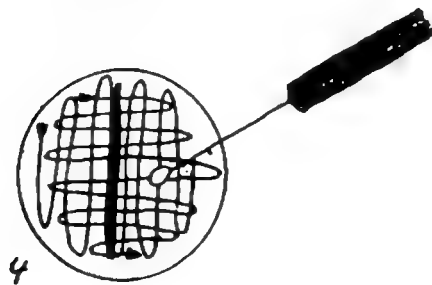
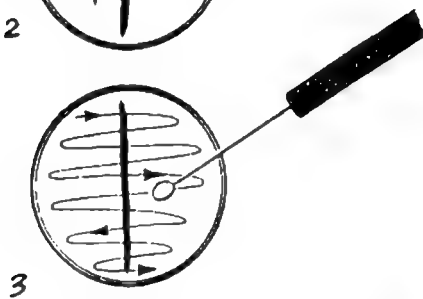
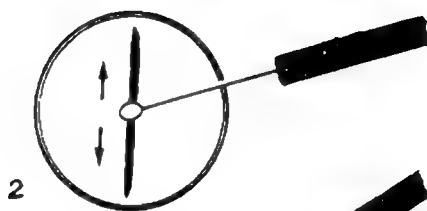
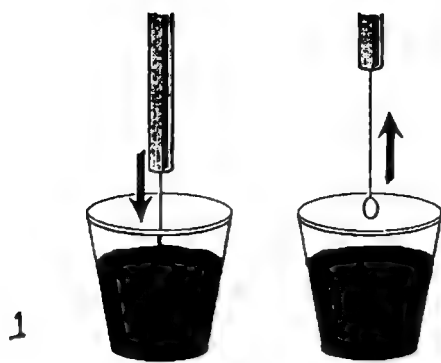
2- توفير جو معقم للقيام بعملية الزراعة .

3- يجب عدم زراعة البول في جو لا هوائي anaerobic وذلك لوجود الساكن

الطبيعي اللاهوائي anaerobic Normal Flora في الاحليل والمناطق المحيطة به

أما إذ كان المسبب المتوقع للالتهاب لا هوائياً فيفضل اخذ العينة عن طريق

إدخال إبرة إلى المثانة وسحب البول منها مباشرة Needle Aspiration .



خطوات زراعة عينة البول

4- لا يفضل عمل طرد مركزي لعينة البول ومن ثم استخدام الراسب للزراعة وذلك لان عملية الطرد المركزي تؤدي إلى زيادة عدد الجراثيم في المليلتر الواحد من العينة كذلك قد تزيد أيضاً من عدد الجراثيم الملوثة غير المرضية القادمة من المحيط الخارجي في العينة .

ولقد أجمع العلماء على أن افضل طريقة لزراعة البول هي الطريقة الكمية Quantitative method وذلك من اجل الحصول على تعداد للبكتريا في المليلتر الواحد من العينة والذي يميز بما يسمى بوحدة تكوين المستعمرة CFU/ml وتستخدم هذه الطريقة للتمييز بين تلوث العينة بالبكتيريا غير المرضية أو وجود الإصابة فعلاً . و تتم عملية الزراعة بأحد الطرق التالية .:

1- طريقة التخطيطيط المباشر Direct streak method .

(باستخدام الحلقة المعدنية القياسية Calibrated Loop) .

وتستخدم هنا حلقة معدنية Loop ذات قطر معين تحمل كمية من العينة تعادل (1000:1) من العينة (0.001ml) حيث يحدد عدد الجراثيم من (امل) من العينة بالقانون التالي:

عدد الجراثيم من المليمتر الواحد من العينة (CFU/ml) :

= حجم Loop (معامل التخفيف) X عدد المستعمرات النامية على الوسط
مثال،

عند زراعة عينة بول بواسطة حلقة معدنية Loop قياسية تم ظهور عشرة مستعمرات على الوسط الزراعي الصلب لذلك فان عدد الجراثيم في المليمتر الواحد من العينة (CFU/ml) هو = $1000 \times 10 = 10,000$ CFU 10,000 (10⁴ ml)

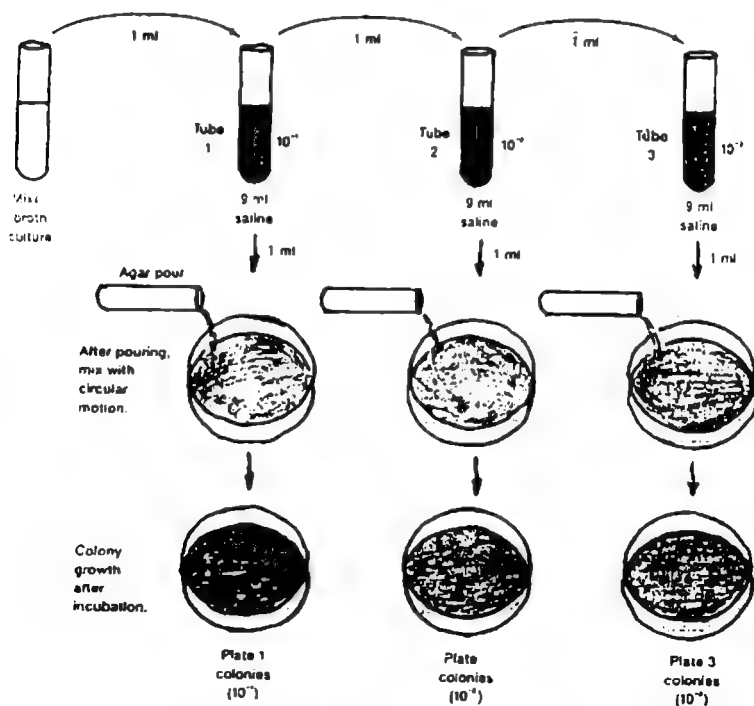
ملاحظة : قد تستخدم حلقة قياسية Loop قادرة على حمل جزء واحد من عشرة أجزاء من العينة 0.01ml لذا يكون معامل التخفيف هنا هو 100 .

وتتم عملية الزراعة بهذه الطريقة بالخطوات التالية .:

1- خلط عينة البول بشكل جيد .

- 2- حرق الحلقة Loop جيداً باللهب ثم تركها حتى تبرد.
- 3- غمس الحلقة في عينة البول (اسفل سطح العينة مباشرة).
- 4- نقل الحلقة بما تحتويه من العينة إلى الطبق المخصص للزراعة وعمل التخطيط كما في الشكل التالي:
- 5- تكرر العملية على كل طبق زراعي كما سبق.
- 6- حضن الأطباق على درجة حرارة 37°م لمدة 24 ساعة في ظروف هوائية.
- 7- مراقبة النمو فإن لم يظهر النمو خلال 24 ساعة تترك الأطباق ليوم آخر (48 ساعة) في الحاضنة وعند بقاء الوضع كما هو عليه في عدم ظهور النمو تسجل النتيجة كالتالي . No growth after 48 hours.

2- طريقة الصب Pour plate method.



خطوات زراعة عينة البول بطريقة الصب

لا تعطي هذه الطريقة نتيجة حقيقية لعدد البكتيريا في العينة وذلك بسبب حدوث تجمعات Clumps من المستعمرات والتي تبدو كمستعمرة واحدة عند العد إلا إنها تعتبر من أدق الطرق المتبعة لمعرفة عدد البكتيريا وتجري هذه الطريقة كالآتي:
أ - تحضير ثلاث تخفيفات للبول مع الماء المقطر والمعقم في أنبوب محكم الإغلاق كالآتي:

$$10:1 = 1 \text{ مل بول} + 9 \text{ مل ماء}$$

$$100:1 = 1 \text{ مل من التخفيف السابق (10:1)} + 9 \text{ مل ماء}$$

$$1000:1 = 1 \text{ مل من التخفيف السابق (100:1)} + 9 \text{ مل ماء}$$

ب: ينقل 1مل من كل تخفيف إلى طبق زراعي (يحتوي على 15-20 مل من Nutrient agar مذاب ومبرد درجة حرارته 50م°) ثم يخلط ويترك ليجمد على درجة حرارة الغرفة .

ج- تحضن الأطباق الثلاثة في الحاضنة على درجة حرارة 35 م° لمدة 24 ساعة .

د- تقرأ النتائج بعد 24 ساعة من الحضانة وتعد المستعمرات في كل طبق ويضرب العدد في معامل التخفيف لكل طبق .

مثلاً : إذا كان عدد المستعمرات في الطبق الأول 200 مستعمرة فيكون عدد البكتيريا في 1مل من العينة هو $10 \times 200 = 2000$ بكتيريا لكل مل من العينة .

الأوساط الزراعية Culture media .

تزرع عينة البول غالباً على نوعين من الأوساط الزراعية ::

أ - الأول وسط الدم Blood agar وهو وسط غني وملامئ لنمو معظم أنواع البكتيريا الموجبة و السالبة لصبغة غرام.

ب- أما النوع الثاني فهي أوساط اختيارية مفرقة مثل EMB و MacConkey agar إذ أنها أوساط ملائمة لنمو البكتيريا السالبة لصبغة غرام فقط وتعطى دلالة لونية على البكتيريا القادرة على تخمير اللاكتوز .

كذلك يمكن استخدام أوساط أخرى خاصة بأنواع معينة من البكتيريا مثلاً عند الشك بوجود بكتيريا M.tuberculosis يجرى للعينة طرد مركزي ويأخذ جزء من الراسب ويصنع بصبغة Ziehl Neelsen stain ثم يحقن الجزء الآخر في وسط L.J.media وقد تستخدم أوساط أخرى خاصة بالفطريات مثلاً وسط SDA.

ويستخدم أيضاً الوسط السائل Thyogluccolate broth كوسط غذائي في حل كون عدد الجراثيم قليلاً في عينة البول أو في حالة الشك بوجود جراثيم لا هوائية، ونادراً ما تستخدم أوساط أخرى خاصة بالفيروسات وغيرها من الكائنات الدقيقة الأخرى التي يتم تشخيص الإصابة بها بطرق أخرى غير الزراعة مثل الطرق المصلية Serology .

تقييم نتائج الزراعة وتشخيص المسبب .

يتم تقييم نتائج زراعة عينة البول من خلال مجموعة من الخطوات مجتمعة مع بعضها البعض وتتلخص بما يلي:

أولاً، تحديد نوع الكائن الموجود في العينة Type of organism .

يتم تحديد الكائن المسبب للالتهاب بعد عملية الزراعة من خلال خطوات متسلسلة ودقيقة يتبعها التعرف إلى نوع الكائن الدقيق المسبب للالتهاب والتمييز بين كون هذا الكائن الناتج من عملية الزراعة مريضاً أو كونه ساكناً طبيعياً وملوثاً للعينة ويتم ذلك من خلال ثلاث خطوات عامة كما يلي:

- 1- دراسة صفات المستعمرات النامية في الأطباق لتحديد لون وشكل المستعمرة.
 - 2- عمل صبغة غرام Gram stain للتعرف إلى شكل وترتيب البكتيريا وتفاعلها مع الصبغة.
 - 3- إجراء الفحوصات البيوكيميائية Biochemical test للوصول إلى تحديد نوع الكائن الدقيق المسبب للالتهاب نهائياً.
- ويتم تشخيص الكائنات الدقيقة المسببة لالتهابات المسالك البولية UTI والأكثر شيوعاً كما يلي .:

١ ظهور نمو على وسط Blood agar وعدم ظهور النمو على MacC أو EMB. يعني ذلك إن البكتيريا النامية هي موجبة لصبغة غرام (G +ve) إذ يتم إجراء صبغة غرام Gram stain على النمو للتأكد من ذلك ولمعرفة شكل البكتيريا هل هي عصوية Bacilli أم كروية Cocci كذلك يمكن التعرف علي ترتيب البكتيريا بواسطة الصبغة فظهور الترتيب العنقودي دلالة على بكتيريا Staphylococcus أما بكتيريا Streptococcus فتكون مرتبة بشكل سلسلة (سبحية) .

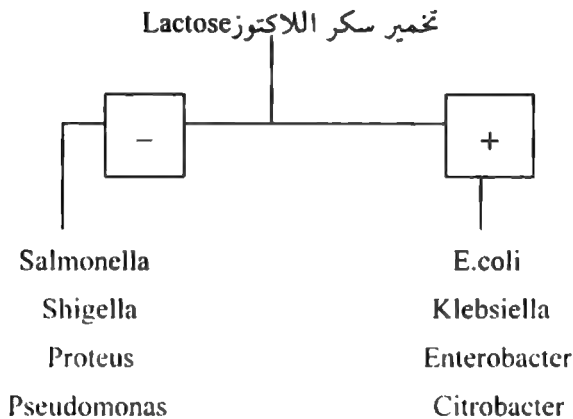
ويتم التفريق بين بكتيريا Staph و Strept بواسطة فحص Catalase وبواسطة شكل المستعمرات ولونها وتحليلها للدم كما في الجدول اللاحق.

وجه المقارنة	Staphylococcus	Streptococcus
النمو على وسط Blood agar	+	+
النمو على وسط EMB و MacC.	-	-
فحص Catalase	+	-
حجم المستعمرات على الأوساط بعد مرور 24 ساعة في الحاضنة.	3-5mm	1-2mm
شكل البكتيريا .	كروية على شكل عنقايد Cluster	كروية تنتظم على شكل سلاسل
تفاعلها مع صبغة غرام.	موجبة	موجبة
تحليلها للدم .	غير محللة للدم ما عدا S.aureus	معظمها محللة للدم
شكل المستعمرات.	مرتفعة من الوسط على شكل القبة	قرصية الشكل
لون المستعمرات.	ابيض إلى اصفر ذهبي	ابيض حليبي

2- أما ظهور النمو على كلا الطبقين Blood agar و MacC. أو EMB.

فهذا يدل على إن البكتيريا النامية على الوسط هي سالبة لصبغة غرام - (G ve) لذا يتم إجراء صبغة غرام لتحديد هل البكتيريا عسوية أم كروية وفي الغالب تكون البكتيريا العسوية السالبة لصبغة غرام هي اكثر المسببات لالتهابات المسالك البولية .

ويتم أيضا معرفة هل البكتيريا غمرة أم غير غمرة لسكر اللاكتوز مباشرة من خلال النمو على MacConkey agar فظهور اللون الوردي Pink colour دلالة على تخمير سكر اللاكتوز.



* ويمكن تميز E.coli عن Enterobacter على وسط EMB بظهور اللون الأخضر اللامع Metallic sheen الخاص ببكتيريا E.coli.

* أما ببكتيريا Proteus فتميز بنموها المتشعر (Swarming) spreading growth على أي نوع من الأوساط السابقة .

* ويتم تميز ببكتيريا Klebsiella بسهولة من خلال تكوينها لمستعمرات مخاطية على نوعي الأوساط السابقة.

3- أما الفطريات وخاصة فطر Candida تظهر مستعمراتها على Blood agar أو MacConkey مشابهة لمستعمرات بكتيريا Staph. ويمكن تمييز مستعمرات Candida عن مستعمرات البكتيريا من خلال الصبغ بصبغة غرام أو عمل

فحصي catalase و Coagulase إذ أن الفطريات لا تأخذ الصبغة دائماً وتعطي نتيجة سلبية للفحصين السابقين . ويفضل عمل تحضير رطب Wet mount من العينة مباشرة أو المستعمرات لتشخيص الفطريات التي تكون علي شكل خلايا بيضوية متبرعمة اكبر حجماً من البكتيريا .

ثانياً :- تحديد عدد الجراثيم في (١ مل من العينة) :

إن عدد المستعمرات الناتجة ذات دلالة مرتبطة في نوع الكائن النامي في الطبق إذ إن زيادتها يؤكد وجود التهاب ويتم تحديد عدد الأحياء الدقيقة كما ذكرنا سابقا بوحدة تكوين المستعمرة Colony forming unite(CFU) والتي تعرف على أنها عدد الأحياء الدقيقة الموجود أصلاً في امل من العينة الأصلية والتي تعطي مستعمرات فيما بعد على الأوساط الزراعية ويتم معرفة عدد الأحياء الدقيقة في امل من العينة من خلال معرفة عدد المستعمرات النامية و ضربه في مقلوب التخفيف كما أسلفنا .

وقد أظهرت الدراسات ارتباط عدد الأحياء الدقيقة في العينة بوجود الالتهاب من خلال ما يلي (وهذا خاص بعينة البول الوسطية وباستخدام حلقة معدنية Loop قطرها 0.001 ml) .

- 1- اقل من (10^3 CFU/ml) $< 10^3$ تسجل النتيجة No growth .
 - 2- وجود مستعمرات لنوع واحد من البكتيريا .
 - 3- اقل من (10^4 CFU/ml) $< 10^4$ احتمال تلوث العينة أو وجود الالتهاب ويحدد ذلك بوجود الأعراض .
- * ما بين 10^4 - 10^5 CFU /ml احتمال وجود الالتهاب لذلك يتم إجراء التشخيص أو فحص الحساسية للمضادات الحيوية على النمو .
- * 10^5 CFU/ ml أو أكثر تأكيداً لوجود الالتهاب .
- * ظهور S.aureus بأي عدد ذو دلالة مرضية .
- * ظهور مستعمرات Yeast تسجل كنتيجة ذات دلالة مرضية .

ومن الجدير بالذكر انه في العديد من حالات التهاب المسالك البولية ونتيجة لعوامل متعددة يكون عدد المستعمرات النامية اقل من 10^3 CFU/ ml حيث تسجل النتيجة وتشخص ويجرى لها فحص الحساسية ويترك للطبيب الأمر اعتماداً على الأعراض ووجود كريات الدم البيضاء Pus cells في العينة .

3- ظهور نمو لنوعين من البكتيريا في الوسط،

وهذا يتطلب إعادة الزراعة مرة أخرى واخذ البول من المريض في ثلاثة أوعية الوعاء الأول والثاني يحتوي على البول الموجود في التحليل أما الوعاء الثالث فيحتوي على البول الموجود في المثانة ويتم زراعة عينه من كل وعاء على وسط زراعي منفصل حيث تستخدم هذه الطريقة لتمييز حالة تلوث العينة بالبكتيريا الطبيعية الموجودة في التحليل عن حالة الالتهاب أما إذا أعيدت الزراعة وظهر نفس النوعين فيتم إتباع ما يلي .:

* في حال نمو كلا النوعين بأعداد تزيد عن 10^5 CFU/ ml يتم تشخيص النوعين وإجراء فحص الحساسية لكل نوع وحده.

** في حال ظهور نوع بأعداد تزيد عن 10^4 CFU/ml والنوع الآخر بأعداد اقل من 10^4 CFU/ml فيكون النوع الأكثر في العادة هو المسبب للالتهاب فيشخص ويجرى له فحص الحساسية للمضادات الحيوية ويتم تسجيل النوع الثاني بدون إجراء فحص الحساسية له.

* أما في حالة ظهور النوعين بأعداد اقل من 10^4 CFU/ ml فيكون الاحتمال الأكبر إن وجودهما هو تلوث للعينة . ولكن يتم ذكر ذلك بتقرير المختبر .

4- ظهور ثلاثة أنواع أو أكثر من البكتيريا Mix growth ،

أ- إذا كانت الأعداد متساوية بدون وجود نوع يزيد بعدد المستعمرات عن الأنواع الأخرى فيعتبر ذلك تلوثاً للعينة .

ب- عند ظهور نوع سائد ويميز بعده عن الأنواع الأخرى يعامل النوع السائد كمسبب للالتهاب ويشخص ويجرى له فحص حساسية للمضادات الحيوية

ويتم ذكر الأنواع الأخرى فقط إذ إن وجودها في الغالب تلوث للعينة.
وهناك طرق أخرى تساعد في التشخيص و الاستدلال على وجود الالتهاب
وهي :

- * إجراء صبغة غرام Gram stain للعينة مباشرة وتتم كما يلي :
 - يتم اخذ قطرة من عينة البول مباشرة وبدون عملية الطرد المركزي .
 - توضع القطرة على شريحة زجاجية دون أن يتم نشرها ثم تترك لتجف.
 - يتم صبغ التحضير بصبغة غرام وفحصها تحت العدسة الزيتية .
- النتائج :

ظهور بكتيريا واحدة أو أكثر في حقل المجهر وتحت العدسة الزيتية دلالة على وجود البكتيريا في البول بعدد أكثر من 10^5 CFU/ ml كذلك ظهور كرية دم بيضاء واحدة متعددة الأنوية (PMN) أو أكثر في حقل المجهر وتحت العدسة الزيتية دلالة على وجود الالتهاب . مع العلم إن هذه الطريقة (الصبغة) غير دقيقة في تحديد العدد البكتيري الأقل من 10^5 CFU/ ml .

شريط البول Dipstick ،

يستخدم في المختبرات شريط (strip) يحتوي على عدة مربعات أهمها مربعان يدل أحدهما على وجود النترات Nitrite أما الثاني فيدل على وجود كريات الدم البيضاء المحببة Leukocytes .

إذ يدل مربع Nitrate على وجود بعض البكتيريا و القادرة على اختزال النترات Nitrate إلى Nitrite وهي مثل E.coli و Proteus و Pseudomonas أما المربع الثاني فهو يعطي دلالة على وجود كريات الدم البيضاء المحببة في البول إذ يكشف عن وجود أنزيم Leukocyte esterase الذي تنتجه كريات الدم البيضاء المحببة .

التحليل الآلي لعينة البول Automated screening system

في الوقت الحاضر ظهرت عدة طرق آلية لتحليل عينة البول جرثومياً وأهم هذه التقنيات هي:

1- تقنية Bac-T-screen

تستخدم هذه التقنية للكشف عن وجود البكتيريا في البول إذ تستخدم هنا ورقة ترشيح خاصة Filter paper معدة للقراءة في جهاز الطيف الضوئي Spectro photometer حيث تمرر عينة البول خلال ورقة الترشيح تحت ضغط سلبي (Suction) فتلتصق الجزيئات الموجودة في العينة على الورقة ثم تمرر صبغة خاصة عبر الورقة نفسها فيتم تلوين الجزيئات الملصقة بها ثم تقرا الورقة في جهاز الطيف الضوئي وتقارن مع ورقة أخرى معيارية Standard .

ويمكن إن يلاحظ تغير اللون بالعين المجردة حيث تتم هذه العملية في وقت لا يتجاوز الدقيقتين وإذا لم يتغير لون الورقة تكون النتيجة سلبية ويتوقف العمل عند هذه المرحلة أما إذا تغير لون الورقة فيتم زراعة العينة على أوساط زراعية لتشخيص المسبب.

2- تقنية Automicrobic system

وهي طريقة آلية أخرى لتحديد مسبب التهاب المسالك البولية وتعتمد هذه الطريقة على قياس النمو البكتيري بجهاز الطيف الضوئي حيث يتم إدخال جزء من العينة في أوعية خاصة بهذه التقنية ، تحتوي على مواد غذائية خاصة بنمو البكتيريا المسببة لالتهابات المسالك البولية فقط ثم يتم حضانة هذه الأوعية وبعد 6-8 ساعات يبدأ الكائن الدقيق بالنمو و التكاثر إن وجد ويتم تحديد ذلك من خلال تزايد العكورة turbidity بواسطة جهاز الطيف الضوئي الخاص بهذه التقنية ويكون هذا الجهاز معداً آلياً للتعرف على البكتيريا وقراءة العدد إذ إن الجهاز مبرمج لإعطاء نتيجة سلبية Negative urine culture في حال ظهور عدد قليل من المستعمرات البكتيرية .

التهاب البروستات Prostatitis :

توجد غدة البروستات في الذكور وهي تطرح إفرازاتها في مجرى البول وقد تتعرض هذه الغدة للالتهاب بعدد من الأحياء الدقيقة وتستخدم عينة البول في بعض الحالات لتشخيص التهاب البروستات وقد تعطى زراعة البول نتيجة خاطئة في حال وجود التهاب بروستات غير مشخص ويترك تحديد ذلك للطبيب المشرف. الأحياء الدقيقة المسببة لالتهاب البروستات ::

1- الالتهاب البكتيري :

أ- المسببات الأكثر شيوعاً *Pseudomonas* و *Klebsiella* و *E.coli* .

ب- المسببات الأقل شيوعاً *Staph.epidermidis* و *Strep.faecalis* .

2- الالتهاب البكتيري الذي يعطى نتيجة زراعة سلبية No growth وينتج من *Mycoplasma* و *Chlamydia* و البكتيريا اللاهوائية .

3- الالتهاب غير البكتيري وقد ينتج من ::

أ- الطفيليات مثل *T.vaginalis* .

ب- الفطريات مثل *C. albicans* .

التشخيص :

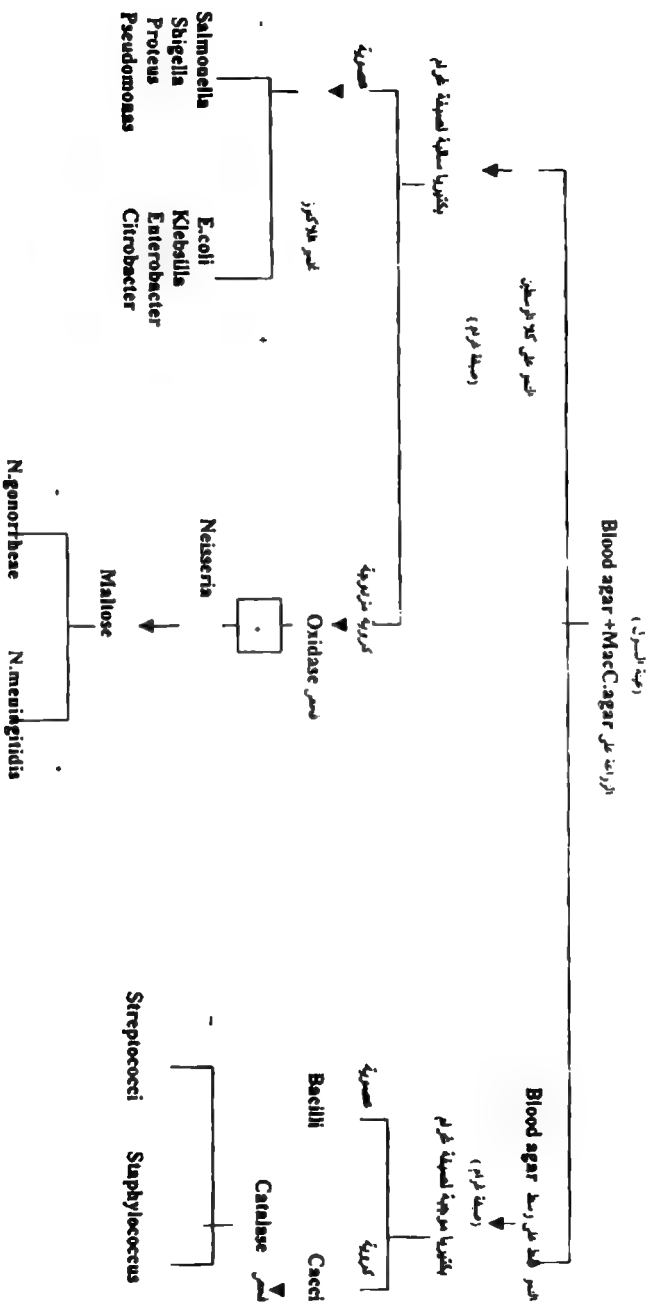
يعتبر البول والحيوانات المنوية و الإفرازات الناتجة من تدليك البروستات هي العينات المستخدمة في تشخيص التهاب البروستات إذ يتم زراعة العينة ومعاملتها بشكل مشابه لمعاملة عينة البول .

ملاحظة :

انه لمن الضروري بعد عملية الزراعة و تشخيص البكتيريا المسببة للالتهابات إجراء فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية (susceptibility) إذ يتم إجراء هذا الفحص لأي نوع بكتيري ينمو بعد زراعة أية عينة مرضية من أجل اختيار أنسب مضاد حيوي للنوع البكتيري النامي في الوسط الزراعي وتزويد الطبيب بنتيجة هذا الفحص مع نتيجة الزراعة .

كيفية إجراء فحص الحساسية و العوامل المؤثرة فيه انظر الملاحق .

مخطط مبني على مخرج التلخيص للبكتيريا المسببة التهاب المسك قلبية



الباب الثاني

(التهابات الأمعاء Gastroenteritis)

عينة البراز (Stool specimne)

مقدمة :

تتألف القناة الهضمية في الإنسان Gastro Intestinal tract من عدة أعضاء متحلة فيما بينهما على شكل قناة مفتوحة الطرفين حيث تتركز فيها عمليات هضم وامتنصاص المواد الغذائية ليأخذ الجسم الجزء اللازم له ويطرح ما تبقى من هذه المواد إلى الخارج على شكل براز (Feces , Stool) .

وتكون القناة الهضمية عند المواليد الجدد معقمة Steril إذ تبدأ الجراثيم بالدخول إليها مع الطعام والشراب لتكون مجتمعاً جرثومياً يتعايش مع الإنسان كساكن طبيعي Normal Flora وتزداد كثافة وعدد الأحياء الدقيقة الموجودة في الأمعاء كلما اتجهنا إلى الأسفل فمثلاً تحتوي المعدة Stomach على حوالي 10^3 - 10^5 كائن حي دقيق لكل غرام من محتوياتها مع أن حامضيتها العالية الناتجة من إفراز HCL ووجود هرمون البيسين تؤدي إلى قتل العديد من الجراثيم ومنع دخولها إلى الأمعاء ومع ذلك فإن زيادة الساكن الطبيعي في المعدة لأي سبب قد يؤدي إلى حدوث تقرحات التهابات فيها .

وقد تستطيع بعض الجراثيم الضارة مقاومة حامضية المعدة والعبور إلى الأمعاء مثل بكتيريا السل T . B وبكتيريا H. pylori أو نتيجة لتكوينها للأبواغ Spores مثل بكتيريا C difficile،

أما في الأمعاء الدقيقة فيساعد الوسط القاعدي على تكاثر و زيادة الساكن الطبيعي فيها والذي يتراوح ما بين 10^6 - 10^3 لكل غرام من المحتويات إلا أن سرعة مرور الطعام الناتجة من الحركة الدودية للأمعاء تؤدي إلى بقاء العدد قليلاً مقارنة مع

العدد الموجود في نهاية الأمعاء إذ يحتوي كل غرام واحد من مكونات القولون والمستقيم على 10^{10} - 10^{11} كائن حي دقيق والتي تكون حوالي 10-30% من كتلة البراز وذلك يعود إلى بقاء الفضلات في المستقيم والقولون لفترات زمنية طويلة نسبياً.

وتكون نسبة البكتيريا اللاهوائية حوالي 96-99% من مجمل الساكن الطبيعي للأمعاء بينما تشكل البكتيريا الهوائية الاختيارية حوالي 1-4% من مجمل الساكن الطبيعي في قولون الأشخاص البالغين ويلعب الساكن الطبيعي في أمعاء الإنسان دوراً مهماً في ::

1- المساعدة في تحطيم بعض المواد الغذائية التي يعجز الجسم عن تحطيمها مثل السيلولوز للاستفادة منها .

2- المساعدة في إنتاج مواد مفيدة للجسم مثل Vit.K .

3- امتصاص بعض المواد الضارة بالجسم وتحويل بعض المواد مثل الصفراء Bile إلى مواد غير ضارة للجسم.

4- حماية الجسم من زيادة أعداد البكتيريا المرضية الداخلة إلى الأمعاء وبالتالي وقاية الجسم من الإصابة إذ أن انخفاض الساكن الطبيعي في الأمعاء لأي سبب مثل تعاطي كميات كبيرة من المضادات الحيوية يؤدي إلى خفض مقاومة الأمعاء للإصابة وحدوث الإسهالات والتهاب الأمعاء المرتبطة بالمضادات الحيوية Antibiotic-associated colitis أو ما يسمى بالتهاب القولون ذي الغشاء الكاذب Pseudo membranous colitis و الناتج من سموم البكتيريا الموجودة بالأمعاء بأعداد قليلة حيث يؤدي تناول كمية عالية من المضادات الحيوية كما أسلفنا إلى خلل في نسبها وزيادة كمية سموم هذه الأنواع التي تؤثر على الأمعاء.

التهابات القناة الهضمية Gastroenteritis :

تحدث التهابات القناة الهضمية نتيجة للإصابة بعدة أنواع من المسببات مثل البكتيريا والفيروسات ويعتبر ألم البطن والغثيان والتقيؤ والإسهال والحمى أحياناً

• جمع ونقل عينة البراز من أجل الزراعة Stool Collection and Transport

من أجل جمع عينة براز سليمة ومفيدة في عملية تشخيص مسببات التهابات القناة الهضمية يجب اتباع التعليمات التالية .:

- 1- يجب جمع عينة البراز في أوعية نظيفة ومعقمة ويفضل إن تكون بلاستيكية ويتم إغلاقها مباشرة بعد وضع العينة فيها.
- 2- يفضل جمع 2-3 عينات بأوقات مختلفة وذلك لزيادة احتمالية عزل الكائن المسبب للالتهاب .
- 3- يجب إن لا يقل حجم عينة البراز عن 2 غم كعينة كافية للزراعة .
- 4- يجب زراعة العينة في وقت لا يتجاوز الساعتين من إعطائها من قبل المريض وإذا أخذت العينة خارج المختبر يجب إيصالها إليه بأسرع وقت ممكن .
- 5- إذا تعذر زراعة العينة بسرعة يجب إن توضع في عبوة مع وسط نقل Transport media مثل وسط Cary-Blair أو أوساط Stuart ، ويستخدم ماء البيتون القاعدي AlkalinePeptonewater كوسط حفظ ونقل مناسب لنقل العينات المشكوك باحتوائها على جرثومة الكوليرا Vibrio SPP ولا يفضل استخدام glycerol كمادة حافظة وذلك لسميتها لبكتيريا Campylobacter كما يمكن وضع العينة في الثلجة على درجة حرارة 2-8 م° لفترة لا تتجاوز 24 ساعة .

المراحل المتبعة في فحص عينة البراز .:

1- الفحص الظاهري Macroscopic Examination

و يتم هنا ملاحظة قوام ولون العينة وملاحظة وجود المخاط أو الدم أو أطوار الديدان وغيرها مما يلاحظ بالعين المجردة .

2- الفحص المجهرى Microscopic Examination

و يتم من خلال الفحص المجهرى للتحضير الرطب تحديد مسبب الالتهاب إذا كان من .:

أ- الفطريات مثل *Candida Spp*

ب- الطفيليات وأطوارها مثل الاميبا والديدان وغيرها .

وظهور احد هذه الكائنات قد يكفي لتشخيص التهاب القناة الهضمية
ويستخدم المجهر للملاحظة وجود كريات الدم البيضاء والحمراء في العينة ايضاً
كدلائل على الالتهاب .

3-زراعة عينة البراز وعزل مسبب الالتهاب :

Cultures of stool and Isolation of pathogenic agents :

كما اسلفنا فإن عينة البراز تحتوي على عدد كبير ومتنوع من البكتيريا مما يزيد
من صعوبة عزل البكتيريا المسببة للالتهاب .ومن اجل تسهيل هذه العملية يجب
اتباع ما يلي:

1- عدم زراعة عينة البراز في ظروف لا هوائية وذلك لمنع نمو معظم أنواع الساكن
الطبيعي البكتيري الموجود في العينة مع أن معظم مسببات التهابات الأمعاء
هي بكتيريا هوائية اختيارية .

2- استخدام عدد من الاوساط الاختيارية والمفرقة Selective and differential
media من اجل تثبيط نمو الساكن الطبيعي وتنمية البكتيريا المسببة
للالتهاب فقط بحيث يجب أن تكون الاوساط المستخدمة تغطي الانواع
البكتيرية الشائعة و المسببة للالتهابات المعوية وهي *Campylobacter*
و *vibrio* و *yersinia* و *Shigella* و *salmonella* .

ملاحظة :- لا تعتبر تقنية صبغة غرام Gram stain من الفحوصات الروتينية لعينة
البراز بسبب احتواء العينة على عدد كبير ومتنوع من البكتيريا ولكنها يمكن أن
تعطي الطبيب معلومات حول كون المرض ناتج من دخول البكتيريا
للخلايا Invasive Bacteria أو افرازها للسموم toxigenic Bacteria .

عزل بكتيريا السالمونيلا والشيغلا Isolation of Salmonella and Shigella

تظهر بكتيريا *Shigella* و *Salmonella* في البراز خلال الطور الحاد من

الإصابة أي خلال الثلاثة أيام الأولى من الإسهال بأعداد كبيرة لذلك يفضل اخذ جزء من البراز يحتوى على الدم أو الخلايا الطلائية وحقنة في أوسط الزراعة الخاصة.

اما في حالات صعوبة اعطاء عينة البراز (التعني الحاد Chronic dysentery) تأخذ العينة بوسطة التنظير Proctoscopic أو يمكن اخذ مسحة من المستقيم Rectal swab وزراعتها على أوسط مفرقة واختيارية . ويتم عزل بكتيريا salmonella و shigella على عدة أوساط هي:.

1- أوسط مفرقة قليلة الاختيارية Differential mildly selection media

ويستخدم هنا في العادة وسط MacConkey agar أو EMB حيث يعتبر هذان الوسطان من الأوساط المفرقة التي تميز بين البكتيريا المخمرة للاكتوز والتي تظهر مستعمراتها باللون الوردي وبين غير المخمرة للاكتوز والتي تكون مستعمراتها شفافة غير ملونة وبما أن Salmonella و Shigella غير مخمرة للاكتوز تكون مستعمراتها شفافة اما كون هذه المستعمرات اختيارية فلأنها تعمل على تثبيط معظم أنواع البكتيريا الموجبة لصبغة غرام وتنمي البكتيريا السالبة لصبغة غرام .

2- أوسط مفرقة متوسطة الاختيارية :

Differentially moderately selective media :

وتعتبر الأوساط التالية أهم ثلاثة أوساط تابعة لهذا النوع ويوصى باستخدامها وذلك لقدرتها على تثبيط نمو الساكن الطبيعي في الأمعاء وتنمية Salmonella و Shigella فقط.

أ- وسط Hektoen-Enteric agar :

ويتعتبر هذا الوسط اختيارياً بسبب احتوائه على تركيز عالٍ من أملاح الصفراء Bile salts اما كونه وسطاً مفرقاً بسبب احتوائه على الكربوهيدرات إذ يفرق بين البكتيريا القادرة على تخمير الكربوهيدرات وإنتاج غاز H₂S عن غير القدرة على ذلك .

ويكون لون الوسط الطبيعي اخضر وظهور مستعمرات صفراء دليل على تخمير الكربوهيدرات لذلك تظهر مستعمرات *Salmonella* و *Shigella* شفافة لعدم قدرتها على تخمير الكربوهيدرات الموجودة في الوسط. بينما ظهور نقطة سوداء في منتصف المستعمرة دليل على إنتاج غاز H_2S وترسبه باللون الاسود على المستعمرة وهذا من خصائص بكتيريا *Salmonella*.

وقد تعطي بعض أنواع البكتيريا مثل *Proteus* و *Providencia* و *Morganella* نفس التفاعلات السابقة مع الوسط .

ب- وسط (Xylose-Lysine-Deoxy cholate (XLD :

وهو وسط ذو لون احمر عند تحضيره ولكن يتحول إلى اللون الاصفر في حالة نمو بكتيريا مخمرة للكربوهيدرات علىية وهو مشابه للوسط السابق في كافة نتائجه وتداخلاته مع الانواع البكتيرية الاخرى ويعتبر افضل وسط لعزل بكتيريا *Shigella*.

ج- وسط (S-S agar) *Salmonella - Shigella* agar :

وهو وسط ذو لون قشي فاتح Light straw color وتعطي البكتيريا المخمرة للكربوهيدرات علىية نمواً ذا لون احمر وهو مشابه للسابقة في كافة نتائجه وتداخلاته مع الأنواع البكتيرية الأخرى .

ويستخدم وسط Desoxycholate citrate agar كوسط مفرق متوسط الاختيارية أيضاً لعزل *Shigella* and *Salmonella*.

3- أوساط مفرقة عالية الاختيارية Highly selective media .

مثل وسط Bismuth sulfite agar وهو وسط خاص بتنمية بكتيريا *Salmonella* فقط بسبب احتوائه على تركيز عالي من الصبغة brilliant green وأملاح Bismuth و يكون لونه عند التحضير رمادياً لامعاً حيث تظهر مستعمرات بكتيريا *Salmonella typhi* سوداء اللون محاطة بمنطقة خضراء لماعة metallic sheen بينما الانواع الاخرى من هذه البكتيريا فتظهر اما شفافة أو خضراء أو سوداء .

4-أوساط اختيارية غنية Selective enrichment media .

وهي أوساط سائلة تستخدم للقضاء على كافة أنواع البكتيريا الموجودة في عينة البراز ماعدا بكتيريا Salmonella و Shigella بحيث يتم تنشيط نمو هذين النوعين من خلال المواد الغذائية الموجودة في الوسط إذ يتم حقن جزء من عينة البراز في الوسط السائل ويحضان الوسط لمدة 8-18 ساعة ثم يتم عمل زراعة اخرى Sub culture على أوساط مفرقة للتمييز بين Salmonella and Shigella في حال وجود احدهما . ومن امثلة هذا النوع من الاوساط وسط Selenite broth ووسط Tetrathionate Broth و GN Broth .

خطوات الزراعة Procedures for Culturing stool

ومن اجل عملية عزل دقيقة لبكتيريا Salmonella و Shigella من البراز يفضل اتباع ما يلي:

1 - اخذ كمية من البراز بواسطة ماسحة قطنية Cotton swab.

2- زراعة العينة بواسطة التخطيط بالماسحة القطنية وبقوة على وسطين أو اكثر من الأوساط التالية .ويفضل إن يكون احدهما عالي الاختيارية highly selective والآخر متوسط الاختيارية moderately selective مثل الأوساط التالية .:

- S-S agar
- Hekton enteric aga
- Brilliant green agar
- XLD agar
- Desoxy cholate cirate agar

ويفضل اجراء تخطيط بواسطة الحلقة المعدنية Loop بعد اجراء الزراعة بواسطة الماسحة Swab من اجل الحصول على مستعمرات منفصلة ويمكن وضع جزء من عينة البراز في وسط اختياري غني Selective enrichment media

وبعد فترة من الحضانة يتم اجراء التخطيط Streaking على احد الاوساط السابقة بواسطة الحلقة المعدنية Loop مباشرة .

3- في نفس الوقت يتم نشر جزء من العينة كما في الخطوة السابقة على اوساط مفرقة مثل MacConkey agar and EMB .

4- يفضل استخدام وسط Bismuth sulfite agar لتشخيص الإصابة ببكتيريا التفوئيد وذلك ينشر كمية كبيرة من العينة على سطح الوسط .

5- ويفضل حقن جزء من العينة في وسط اختياري غني Selective enrichment media مثل وسطي Selenite or GN broth ثم يحضن الوسط لمدة 24 ساعة وبعد ذلك يتم نقل جزء من العينة بواسطة الحلقة المعدنية Loop (وبواقع 2-3 مرات) ثم تزرع على وسطين أو أكثر من التالية MacConkey , XLD , EMB .

6- يتم حضن الأوساط المزروعة على درجة 35 م° لمدة 18-24 ساعة وفي حالة عدم وجود النمو تستمر الحضانة لمدة 24 ساعة أخرى (48 ساعة حضانة) بينما يحتاج وسط Bismuth sulfite agar لفترة زمنية أطول من ذلك .

7- بعد فترة الحضانة تفحص الأطباق بدقة باستخدام اضاءة كافية لمشاهدة النمو. النتائج: تظهر مستعمرات Salmonella and Shigella على معظم الاوساط السابقة شفافه وقد تأخذ اللون الاحمر على وسط XLD وتظهر مستعمرات S.typhi سوداء اللون على وسط Bismuth sulfate agar.

عزل بكتيريا Yersinia enterocolitica :

يستخدم وسط Cefsulodin-irgasan-Novobiocin (CIN) agar كوسط اختياري خاص لعزل بكتيريا Yersinia من البراز إذ يتكون هذا الوسط من مواد غذائية متعددة بالإضافة إلى المضادات الحيوية .

حيث يتم نشر العينة على سطح الوسط بواسطة التخطيط ثم يحضن الوسط لمدة 48 ساعة على درجة حرارة الغرفة .تظهر مستعمرات Yersinia بعد

فترة الحضانة بلون زهري لامع bright pink حمراء المركز.

الا أن هذا الوسط يمكن أن يسمح بنمو بكتيريا Citrobacter and Aeromonas واللتين تشبهان Yersinia في ظروف النمو وللتمييز بينهما يتم عمل زراعة اخرى sub culture على وسط Blood agar ثم عمل الفحوصات البيوكيميائية ، ويتم التفريق بين Yersinia و Aeromonas بواسطة فحص Oxidase إذ تكون الاولى سالبة و الثانية موجبة النتيجة لهذا الفحص .

ويمكن عزل Y. enterocolitica على وسطي Blood agar and MacConkey agar إذ تنمو على وسط B.A خلال 24 ساعة مكونة مستعمرات صغيرة وتكون سريعة النمو ومتحركة على درجة حرارة الغرفة وهي غير مخمرة للاكتوز سالبة لصبغة غرام ولفحص Oxidase وموجبة لفحص Urease بحيث يمكن تمييزها عن الانواع الاخرى التي قد تنمو معها على نفس الأوساط بواسطة الفحوصات المصلية و البيوكيميائية .

عزل بكتيريا Vibrio ،

تنمو بكتيريا Vibrio والمسببة لمرض الكوليرا على عدة أوساط الا إن افضل وسط لعزها و للتمييز بين انواعها هو وسط Thiosulfate citrate -bile salts (TCBS) sucrose agar الذي يعتبر وسطاً اختيارياً ومفرقاً خاصاً بتنمية بكتيريا Vibrio إذ تنمو مستعمرات V. Cholera وتكون صفراء اللون على هذا الوسط بينما النوع V. Parahaemolyticus يعطى مستعمرات خضراء اللون على هذا الوسط.

عزل بكتيريا Campylobacter ،

تسبب عدة أنواع من هذه البكتيريا التهابات الأمعاء لدى الإنسان ويتم عزلها من البراز باستخدام أوساط اختيارية خاصة بهذه البكتيريا مثل وسط Campy Blood agar و وسط Skirrows media حيث يتم نشر العينة على الوسط ثم حضن الوسط على درجة حرارة 42م لمدة 48 ساعة بوجود 0% CO₂ .

ويعتبر الوسط الاول افضل وسط لعزل النوع C.Jejuni بينما الثاني فهو مفيد لعزل كافة أنواع هذه البكتيريا . إذ يمكن حضنه على درجة حرارة تتراوح بين 36-37 درجة مئوية .

عزل بكتيريا *Helicobacter pylori* ،

تعتبر هذه البكتيريا من أهم مسببات قرحة المعدة والاثني عشر duodenal (Peptic) ulcer . ويتم عزلها بأخذ عينة نسيجية من مكان التقرح Gastric biopsy ثم اجراء احد الفحوصات التالية على العينة .:

1- عمل مسحة Smear من النسيج المأخوذ من مكان الالتهاب وصبغها بصبغة Giemsa لمشاهدة البكتيريا التي تكون منحنية الشكل curved أو لولبية الشكل spiral .

2- تتشابه هذه البكتيريا مع بكتيريا C. jejuni في الصفات العامة لذلك تزرع عينة النسيج على وسط Campy- Blood agar أو وسط Skirrows media مضاف إليها عدد من المضادات الحيوية مثل Trimethoprim و Vancomycin .

ويمكن زراعة العينة على وسط Chocolate agae أو أي وسط اختياري آخر يضاف لها بعض المضادات الحيوية مثل Amphotericin و Nalidixic acid و Vancomycin لقتل البكتيريا الملوثة للعينة .

ويتم حضن الوسط على درجة حرارة 37م لمدة 3-6 ايام بحيث تظهر مستعمرات لماعة بقطر يتراوح بين 1-2 ملم .

3- تنتج هذه البكتيريا انزيم اليوريز Urease بقوة لذلك يمكن وضع النسيج في وسط سائل Urease media يحتوي على اليوريا بحيث يؤدي إنتاج البكتيريا لانزيم Urease إلى تغير لون الوسط في خلال 15-30 دقيقة من اضافة العينة .

عزل بكتيريا *E.coli* ،

توجد هذه البكتيريا في أمعاء الإنسان كساكن طبيعي إلا أن بعض انواعها المصلية Serotype تسبب الاسهالات لدى الاطفال حديثي الولادة بسبب افرازها

لنوع من السموم ويعتبر النوع المصلي H7: O157 E.coli هو اكثر أنواع هذه البكتيريا المسببة للاسهالات شيوعاً .

إذ يتم اخذ عينة من البراز أو المسحات الشرجية وزراعتها على وسط Blood agar و أوساط اختيارية أخرى مثل MacConkey agar و EMB ثم تخضن الاطباق على درجة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وعند ظهور ثلاث مستعمرات أو أكثر لهذه البكتيريا يتم اخذ جزء من المستعمرة ثم معاملة هذا الجزء مع اجسام مضادة خاصة بكل نوع مصلي لوحده من

أنواع E.coli التي قد تسبب حالات الاسهالات على شريحة خاصة حيث تكون النتيجة الايجابية على شكل تخثر Agglutination .

ويمكن زراعة العينة على وسط Sorbitol MacConkey agar إذ أن 95 بالمائة من أنواع بكتيريا E.coli قادرة على تخمير هذا السكر بينما النوع المصلي H7:O157 يعطي نتيجة سلبية لهذا الفحص (غير قادر إلى تخمير سكر Sorbitol) عزل البكتيريا المسببة للالتهابات المرتبطة بالمضادات الحيوية،

Isolation of antibiotic - associated colitis bacteria:

إن تناول كميات كبيرة من المضادات الحيوية كما ذكرنا سابقاً قد تؤدي إلى خلل في توازن الساكن الطبيعي داخل الأمعاء مما يؤدي إلى زيادة أنواع بكتيرية معينة على حساب أنواع أخرى بحيث يؤدي زيادة نوع معين إلى التهابات معوية مثل التهاب القولون ذي الغشاء الكاذب Pseudomembranous colitis مسبباً حمى واسهالاً وألماً في البطن وأهم أنواع البكتيريا المسببة لذلك هي S.aureus و Cl difficile. التي يتم عزلها بالطرق التالية .:

تزرع بكتيريا Cl.difficile على وسط Cycloserine-Cefoxitin (CCFA) egg yolk agar ثم تخضن لمدة 24 ساعة لتظهر مستعمرات هذه البكتيريا صفراء لامعة دائرية ذات حواف غير منتظمة مسطحة ومنخفضة بقطر 4-8 ملم .

بينما تستخدم عدة أوساط لعزل بكتيريا S.aureus وكافة Coagulase Gram Positive Bacteria تحتوي بالاساس على تركيز عالي من Nacl وهي مثل

وسط 110 Staph.medium و وسط Mannitol salt agar و وسط Polymyxin Staph media.

عزل بكتيريا السل M . tuberculosis

في بعض حالات السل الرئوي خاصة عند الأطفال وكبار السن يصعب اخذ عينة من البلغم لذلك يحتاج الطبيب لعزل عصيات السل من البراز التي قد تكون وصلت إليه نتيجة لنزول البكتيريا من الرئة إلى الأمعاء إذ يتم زراعة العينة على وسط خاص هو Lowenstein-Jensen media و يعتبر عزل هذه البكتيريا من البراز أمراً غير روتيني يحتاج لطلب خاص من الطبيب المعالج .

عزل الفطريات Isolation of fungi

توجد بعض الفطريات وخاصة فطر Candida albicans بشكل الخميرة Yeast cells في أمعاء الإنسان بأعداد قليلة كساكن طبيعي إذ يتأثر عددها ويزداد بضعف مناعة الجسم وقد اشارت بعض المراجع إلى أن وجود خلايا الخميرة Yeast cells وخيوط الفطر Mycelium معاً في البراز ذو دلالة مرضية . بينما ظهور خلايا الخميرة Yeast cells وحدها وبكميات قليلة مظهر طبيعي ، ويتم تشخيص ذلك بعمل تحضير رطب لعينة البراز ومشاهدة الشريحة تحت المجهر .

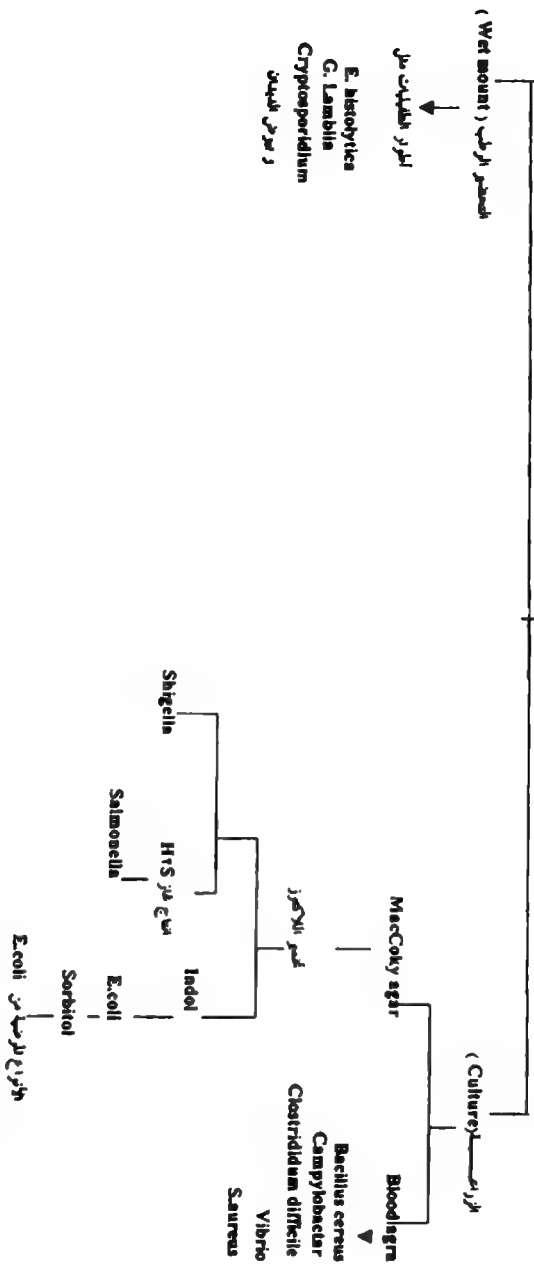
ويتم عزل الفطريات بشكل عام بزراعة العينة على أوساط خاصة بالفطريات سل وسط SDA ثم تخضع على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة ويظهر نمو Candida بشكل مستعمرات بيضاء حليبية مشابهة لمستعمرات البكتيريا . Cream-colored colonies

ملاحظات .

- إن ظهور 1-2 مستعمرة من الانواع البكتيرية الممرضة في عينة البراز يعتبر وجوداً غير طبيعي لذلك يفضل في هذه الحالة اعادة الزراعة مرة اخرى .
- يتم اللجوء في بعض حالات التهابات الأمعاء وخاصة حالات التسمم الغذائي إلى البحث عن سموم البكتيريا في عينة البراز بدل عملية الزراعة بواسطة تقنيات خاصة بذلك .

يجب اجراء الفحوصات البيوكيميائية والزراعة على وسط TSI للمستعمرات النامية على الاوساط الزراعية للتأكد من التشخيص .
يتم اللجوء حالياً في تشخيص وجود بعض البكتيريا المسببة لالتهابات الأمعاء عن طريق الدم من خلال الفحوصات المصلية Serological test بالبحث عن أنتجينات Antigens أو الاجسام المضادة Antibodies التي كونها الجسم نتيجة الإصابة كما في حالة تشخيص بكتيريا Salmonella أو H. pylori .
يجب اجراء فحص التحسس للمضادات الحيوية لأي بكتيريا مرضية تنمو على الاوساط الزراعية وتزويد الطبيب المعالج بالتشخيص ونتيجة الفحص .

مخطط بسيط للتعخيص المبدئي للأنواع البكتيرية الشائعة كمسببات لالتهاب الأمعاء
(رسم مقصود)



نفس الماء للتعخيص من خلال ما يلي:

- 1- لزوجة على لزوجة مزرعة واختبارية مثل S-S agar, MSA, TCBC, Campy BAP مع الأورغ.
- 2- عدل ضغط ومعايرة مع الأورغ.
- 3- اختبار من العدول وأظهر كميته.

الباب الثالث

التهابات الجهاز التناسلي

Genital Tract infection

(مسحات الجهاز التناسلي G.T.swabs)

مقدمة :

يختلف الجهاز التناسلي في الذكر والأنثى عن بعضها البعض من الناحية التشريحية وخاصة في كون الفتحة التناسلية منفصلة عن الفتحة البولية في الأنثى ومشتركة في الذكر وهذا قد يؤدي في الذكر إلى تداخل التهاب الجهازين البولي و التناسلي معاً أما الأنثى فقد يكون التهاب أحدهما سبباً في التهاب الآخر نتيجة لقرب الفتحتين من بعض .

وتكون التهابات الجهاز التناسلي في الإنسان نتيجة للعديد من مسببات البكتيرية و الفيروسية والفطرية التي قد تصل إلى أي جزء من أجزاء هذا الجهاز بحيث تبدأ الإصابة عند الفتحة التناسلية وتتجه راجعة إلى الخلف في حالة الالتهابات المزمنة لتصل باقي الأعضاء .

ويحتوي الجهاز التناسلي للذكر الطبيعي على حوالي $10^3 - 10^2$ كائن حي دقيق كساكن طبيعي في الاحليل Urethra بينما في الأنثى الطبيعية وبعد الولادة مباشرة يبدأ الساكن الطبيعي بأخذ مكانة في منطقة المهبل Vagina واسفل الرحم بحيث توجد أنواع متعددة من البكتيريا اللاهوائية Anaerobic Bacteria وخاصة بكتيريا Lactobacilli التي تعمل على تخمير الجلايكوجين glycogen الموجود في الرحم والمهبل بحيث ينتج في هذه العملية حامض اللاكتيك Lactic acid الذي يعمل على المحافظة على درجة PH حامضية في تلك المنطقة وهذا بدوره يعمل على حماية الأجزاء التي تليه من الجهاز التناسلي الأنثوي بحيث يقتل و يمنع دخول أنواع البكتيريا الممرضة إلى الداخل .

كذلك تفرز الطبقة المخاطية للرحم مواد مضادة للجراثيم مثل أنزيم Lysozyme الذي يعمل على حماية الجهاز التناسلي وقتل الجراثيم الداخلة إليه .

وقد توجد أنواع أخرى من البكتيريا الهوائية و اللاهوائية الكروية Cocci والعصوية Bacilli كساكن طبيعي في اسفل الجهاز التناسلي الأنثوي .

السكان الطبيعي في الجهاز التناسلي الذكري Male G.T Normal flora

يتكون الجهاز التناسلي الذكري من الخصى Testes و البربخ Epididymis و الناقل المنوي Vasdeferens والاحليل Urethra إذ أن جميع السابقة تعتبر معقمة sterile ما عدا مقدمة الاحليل التي تحتوي على عدد من البكتيريا التي تعتبر ساكناً طبيعياً فيه ، متضمنة أنواعاً من السكان الطبيعي الموجود على الجلد والتي لا تشكل مصدراً للإصابة في الظروف الطبيعية منها. والجدول التالي يمثل أهم أنواع السكان الطبيعي في الأحليل .

Coagulase-negative staphylococcus	Micrococci
Staph. aureus	Sterptococcus Spp
Diphtheroids	Non pathogenic Neisseria
Enterobacteriaceae	Mycoplasma Spp
Mycobacterium smegmatis	

السكان الطبيعي في الجهاز التناسلي الأنثوي Female G.T. Normal flora

يعتبر الجهاز التناسلي الأنثوي أكثر تعقيداً من الذكري إذ يمكن تقسيم الإصابة فيه بين جزأين الجزء السفلي ويتضمن الفرج Vulva والمهبل Vagina وعنق الرحم Cervix أما الجزء العلوي فيتضمن الرحم Uterus وأنباب فالوب Fallopian tubes والمبايض Ovaries والتجويف البطني Abdominal cavity حيث يكون الجزء العلوي معقماً sterile بينما يحتوي الجزء السفلي على كمية كبيرة من السكان الطبيعي وتتضمن التالية:

Lactobacilli	Diphtheroids
Coag-Negative Staphylococcus	Bacteroides
Anaerobic Gram –positive cocci	Mycoplasma Spp
Anaerobic Gram –positive Rods	Moraxella
Gardenrella Vaginalis	أعداد قليلة من
Strep.agalactiae (gp.B streptococcus)	Enterobacteriaceae
Actenobacter	Yeast

و تعيش الأنواع السابقة بشكل طبيعي في المهبل وعنق الرحم ولا تحدث الالتهابات ولكن عند انتقالها إلى الجزء العلوي من الجهاز التناسلي الأنثوي تصبح مصدراً للإصابة .

التهابات الجهاز التناسلي ، G.T infection

تحدث الالتهابات في الجهاز التناسلي للإنسان من مصدرين رئيسيين هما:

أ- مصدر داخلي Endogenous

يؤدي انتقال الساكن الطبيعي في المهبل أو عنق الرحم أو الاحليل إلى مناطق أخرى من الجهاز التناسلي إلى حدوث الالتهاب.

ب- مصدر خارجي Exogenous

بحيث يكون مصدر الإصابة هنا كائن حي دقيق يأتي من خارج الجهاز التناسلي أي انه ليس من الكائنات التي توجد كساكن طبيعي في هذا الجهاز .

وتعتبر التالية من العوامل المهمة في حدوث التهابات الجهاز التناسلي .

أ - المعاشرة الجنسية .:

إذ تؤدي المعاشرة الجنسية إلى نقل الإصابة من شخص إلى آخر أو دخول الكائن الممرض إلى الجهاز التناسلي أثناء هذه العملية .

ب- العوامل الميكانيكية .:

مثل استخدام الماسحات swabs أو أدوات الفحص الأخرى وتعتبر عملية الولادة ظرفاً مناسباً لحدوث التهاب الجهاز التناسلي الأنثوي .

ج- الدورة الشهرية :

يكون المهبل وعنق الرحم في الوضع الطبيعي حامضي الوسط بسبب وجود الساكن الطبيعي البكتيري فيه إلا انه ونتيجة للدورة الشهرية يتغير PH إلى قاعدي مما يزيد الفرصة لحدوث الإصابة .

د- الحالة الفسيولوجية :-

قد يتعرض الجسم في بعض الحالات إلى نوع من تدني مناعته بسبب ما مما يؤدي ذلك إلى زيادة غير طبيعية في نوع من أنواع الساكن الطبيعي للجهاز التناسلي مسبباً حالة من الالتهاب فمثلاً تزداد الفرصة للإصابة بالالتهابات في حالة الحمل كذلك فإن تناول بعض المضادات الحيوية بكثرة قد يؤدي إلى قتل بعض أنواع الساكن الطبيعي مما يغير الوسط في المهبل وعنق الرحم من حامضي إلى قاعدي مما يزيد من فرصة حدوث مايسمى بالتهاب المهبل البكتيري Vaginitis الذي تسببه أنواع من البكتيريا أو الفطريات التي تكون بالأصل موجودة بأعداد قليلة في نفس الموقع كساكن طبيعي Normal flora، وتعتبر الكائنات الحية الدقيقة التالية من أكثر مسببات التهابات الجهاز التناسلي:

Enterobacteriaceae	Treponema pallidum
Staph . aureus	Chlamydia trachomatis
Group B Streptococcus	Haemophilus ducreyi
Neisseria gonorrhoeae	Herpes simplex virus
Gardnella Vaginalis	Candida albicans(yeast)
Trichomonas Vaginalis	

إذ ترتبط الأنواع T.pallidum و C.trachomatis و H.ducreyi و HSV بتقرحات الجهاز التناسلي بينما ترتبط الأنواع N.gonorrhoeae and C.trachomatis بالتهابات الاحليل والرحم و أعلى الجهاز التناسلي أما التهاب المهبل البكتيري Vaginitis فيرتبط به الأنواع التالية T.vaginalis و Candida و Strep.agalactica و G.vaginalis و S.aureus وقد تسبب بعض أنواع الساكن الطبيعي في الجهاز التناسلي التهابات فيه نتيجة لأسباب متعددة كما ذكرنا سابقاً .

أما الانواع الجرثومية التالية فهي المسببات الشائعة للأمراض المنقولة جنسياً
:Sexually Transmitted Diseases

البكتيريا :

T.pallidum	Haemophilus ducreyi
Chlamydia trachomatis	N.gonorrhoeae
C. granulomatis	Mycoplasma homin

الفيروسات :

Herpes simplex virus	Papillomavirus
HIV virus	Hepatitis virus(B+C)
Pox virus	

الطفيليات :

T. vaginalis , E. histolytica , Giardia lamblia

الفطريات : Candida albicans

طريقة جمع العينات Specimens Collection

تختلف طريقة جمع عينات التهابات الجهاز التناسلي وذلك حسب موقع الإصابة والمكان المراد اخذ العينة منه وهي تكون كما يلي .:

جمع العينات من الإناث Females.

أكثر العينات شيوعاً في الإناث هي مسحات أسفل عنق الرحم Endocervical swab إذ تؤخذ بمساعدة منظار مهبلي Speculum لتجنب تلوث الماسحة swab بالسائل الطبيعي لمنطقة المهبل Vagina وتعتبر هذه الطريقة غير فعالة لزراعة جرثومة السيلان ، وتؤخذ العينة كما يلي .:

1- ترطيب المنظار Speculum بلل الماء الدافئ .

2- في حال وجود إفرازات زائدة يتم إزالتها بواسطة ماسحة swab ثم رمي الماسحة.

- 3- إدخال ماسحة swab (جديدة ومعقمة) حوالي 2-3 سم في عنق الرحم .
- 4- تحريك الماسحة بشكل دوراني لحوالي 5-10 ثوان حتى تمتص جزءاً من الإفرازات .

5- وضع الماسحة في وسط نقل Transport media أو التعامل معها مباشرةً ويفضل في حالة البحث عن الكلاميديا Chlamydia اخذ كمية من الخلايا الطلائية epithelial cells مع الإفرازات من اجل عمل المسحة smear .

جمع العينات من الذكور Males

اكثر العينات شيوعاً في الذكور هي إفرازات الاحليل Urethral exudate في حل ظهور الإفرازات بكثرة ويمكن اخذ مسحة من الاحليل كما يلي .:

1- عند ظهور الإفرازات بكثرة يتم جمع قطرة واحدة في الصباح الباكر بواسطة ماسحة swab معقمة أو حلقة معدنية loop معقمة ثم تنقل مباشرة إلى الأوساط الزراعية أو إلى شريحة زجاجية لعمل مسحة smear .

2- في حالة قلة الإفرازات يتم إدخال ماسحة swab بعمق 2-3 سم في مقدمة الاحليل وتحريكها بشكل دائري .

3- يتم زراعة المسحة مباشرة أو وضعها في أوساط نقل خاصة .

ويمكن اخذ مسحات من اللوزتين أو القولون rectal swab من اللواطيين Homosexulas وفي المواليد الجدد الذين يحمل انتقال الإصابة لهم من الأم وخاصة في حالة السيلان ،يمكن اخذ مسحة من إفرازات ملتحمة العين Conjunctivla exudate .

كذلك يستخدم البول كعينة لتشخيص بعض التهابات الجهاز التناسلي إلا انه لا ينصح باستخدام راسب البول للكشف عن جرثومة السيلان وقد تستخدم أيضاً إفرازات غدة البروستات Prostatic discharge بعد عمل المساج الشرجي anal massage للزراعة في حالة التهاب البروستات .

الحفظ والنقل Storage and Transport .

يجب فحص وزراعة عينات الجهاز التناسلي دائماً بسرعة ومباشرة بعد اخذ العينة من المريض بحيث يمكن أن تبقى عينات الجهاز التناسلي على درجة حرارة الغرفة لمدة 12 ساعة دون أن يحدث عليها أي تغير . وعند الحاجة لحفظ ونقل العينة بفضل وضعها في أوساط نقل وحفظ خاصة والتي منها :.

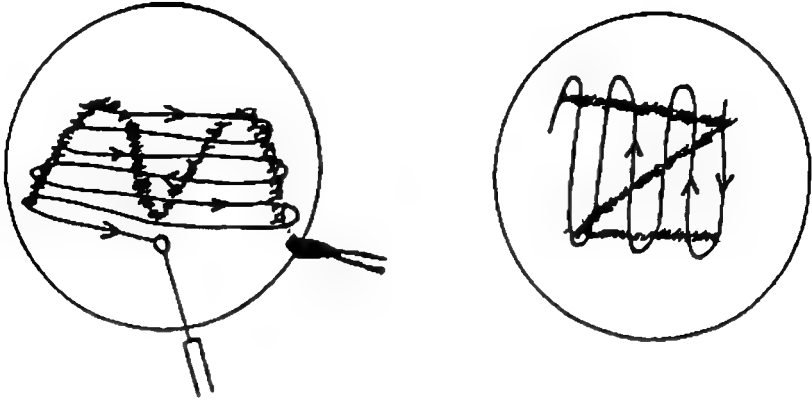
1 - وسط Trans grow

يعتبر هذا الوسط من اقدم أوساط الحفظ المستخدمة في هذا المجال إذ يتكون من وسط Modified Thayar-martin media (MTM) موضوع في عبوة زجاجية إضافة إلى نسبة من CO2 بحيث يحافظ على بكتيريا Neisseria نشطة وجيدة إلا انه ينشط نمو البكتيريا الملوثة أيضا .

2- وسط JEMBEC

يعتبر هذا الوسط افضل من السابق لصغر حجمه وسهولة استخدامه ، ويستخدم لنقل وتنمية جرثومة السيلان إذ يتكون من صندوق بلاستيكي منبسط يحتوي على وسط MTM و وسط (NYC) Newyork City agar وأقراص مكونة من بيكربونات الصوديوم وحامض الستريك citric acid تعمل على توليد غاز CO2.

حيث يتم زراعة العينة على بواسطة تمرير الماسحة swab على سطح الوسط بشكل حرف (Z) أو (W) مع إدارة الماسحة أثناء الزراعة لنقل اكبر عدد من الجراثيم إلى الوسط ثم يتم عمل تخطيط عرضي بواسطة الحلقة المعدنية Loop. ثم يتم حفظ الوسط في درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة قبل عملية النقل أو الزراعة ولقد تم تعديل مكونات هذا الوسط ليصبح اسمه وسط Gono-pak. ويعتبر هذان الوسطان مفيدان في حال وجود جرثومة السيلان.



طريقة زراعة عينات الجهاز التناسلي

3- وتستخدم أوساط أخرى لنقل وحفظ العينات مثل وسطي Amies و stuart's Transport media.

4- أما العينات التي يتوقع وجود Mycoplasma فيها فتحفظ في وسط مكون من trypticase soy broth و bovine albumin .

الزراعة والتشخيص Culture and Diagnosis

يفضل التعامل مع عينات الجهاز التناسلي مباشرة ويتم ذلك على عدة خطوات وهي كما يلي :

أ- عمل مسحة smear من العينة ثم صبغها بصبغة غرام ويمكن الاستفادة من هذه التقنية في تشخيص عدة أنواع من البكتيريا وخاصة بكتيريا *N.gonorrhoeae* وبكتيريا *Gardenrella vaginlis* إذ يتم تمرير المسحة swab على الشريحة الزجاجية بشكل دائري وبشدة ثم إجراء عملية الصبغ وتكون النتائج كما يلي:
أ- ظهور خلايا كروية سالبة لصبغة غرام مزدوجة الترتيب diplococcus داخل وخارج كريات الدم البيضاء pus cells دلالة على وجود بكتيريا *N.gonorrhoeae*.

ب- ظهور خلايا Clue cells دلالة على وجود بكتيريا *G.vaginalis* أحد مسببات التهاب المهبل البكتيري Bacterial Vaginitis وهي عبارة عن

خلايا طلائية من المهبل مغطاة ببكتيريا سالبة لصبغة غرام منحنية أو عصوية كروية coccobacilli مع غياب البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة غرام .
ج- ويمكن مشاهدة أنواع أخرى من البكتيريا مثل S.aureas حيث تفضل إجراء الزراعة للإفرازات للتأكد من البكتيريا بشكل دقيق .

2- إجراء التحضير الرطب Wet mount للعينات : تعتبر هذه التقنية مفيدة في التعرف على مسبب الالتهابات الطفيلية و الفطرية مثل وجود طفيلي T.vaginalis وفطر Candida Spp إذ يتم عمل التحضير الرطب للكشف عن وجود الفطريات بإضافة 10% KOH إلى العينة لمشاهدة خلايا بيضوية متبرعمة budding yeast وخيوط فطرية hyphae ومشاهدة دلائل الالتهابات أيضا كوجود المخاط وكريات الدم البيضاء القليحية pus cells.

3- الزراعة Culturing : يتم زراعة عينات الجهاز التناسلي كغيرها من العينات للتعرف على الكائن الحي المسبب للالتهاب إذ يستخدم لهذا الغرض عدة أوساط هي :

أ- يستخدم وسطي Blood agar و MacConkey أو EMB للتعرف على العديد من مسببات الالتهابات البكتيرية S.aureus مثل ومجموعة Enterobacteriaceae .

ب- وتستخدم عدة أوساط اختيارية لتنمية بكتيريا N.gonorrhoeae مثل وسط Thayer martin chocolate agar إذ يتم حضن هذه الأطباق على درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 24-48 ساعة وفي حال عدم ظهور النمو تحضن الأطباق لمدة 24 ساعة أخرى (72 ساعة) حيث يعتبر وسط MTM هو أكثر الأوساط شيوعا لتشخيص هذه البكتيريا وتستخدم أوساط أخرى لزراعة هذه البكتيريا مثل وسط (ML) Martin -Lews ووسط NewYork city agar.

ج- يتم زراعة العينات المحتوية على الفطريات على وسط SDA .

- 4- وتستخدم تقنيات أخرى لتشخيص مسببات التهابات الجهاز التناسلي وخاصة الأنواع التي لا تنمو على المزارع البكتيرية الروتينية فمثلاً .
- أ- تستخدم المزارع النسيجية Tissue culture لتنمية وعزل العديد من الميسبات مثل Chlamydia والفيروسات مثل HSV.
- ب- تستخدم تقنية الحقل المظلم Dark-field technique لتشخيص البكتيريا المسببة لمرض الزهري (السفلس) Treponema pallidum .
- ج- وتستخدم الفحوصات المصلية Serology بشكل عام للكشف عن وجود الكائن المسبب عن طريق الكشف عن وجود الأجسام المضادة التي كونها الجسم نتيجة للإصابة في الدم وتستخدم هذه التقنية غالباً للكشف عن الأمراض المنتقلة جنسياً Sexually Transmitted diseases .

التهابات الجهاز التنفسي

Respiratory Tract infections

مقدمة :

يقسم الجهاز التنفسي إلى قسمين علوي وسفلي إذ يشمل الجزء العلوي الأنف nose والفم mouth والبلعوم pharynx أما الجزء السفلي فيشمل باقي أجزاء الجهاز التنفسي .

ويكون الجهاز التنفسي معقماً عند الولادة وخلال ساعات تبدأ الأحياء الدقيقة بالدخول إليه مع التنفس ليتكون مجتمع الساكن الطبيعي فيه ، حيث تعيش فيه أنواع عديدة من الأحياء الدقيقة كساكن طبيعي و بأعداد قليلة إلا أنها قد تصبح انتهازية وتسبب التهابات متعددة في حالات معينة .

ويحتوي الجهاز التنفسي على آليات عدة لتقية الهواء وتقليل الجراثيم الداخلة إليه تبدأ بالشعيرات الموجودة في الأنف والإفرازات المخاطية المبطنة للأنف ، الغم التي تحتوي على أجسام مضادة مثل IgA وأنزيمات محطمة للجراثيم مثل أنزيم Lysozyme .

ويقل عدد الجراثيم كلما اتجهنا إلى اسفل الجهاز التنفسي إذ أن الأهداب والمخاط المبطن للقنوات الهوائية والأفعال المنعكسة مثل السعال والعطس جميعها تقلل الجراثيم الداخلة إلى القصبات فتبقىها شبه معقمة باستمرار وإذا ما تم وصول بعض الجراثيم إلى الحويصلات الهوائية alveolae فإن كريات الدم البيضاء الملتزمة Macrophage تعمل على التهامها والقضاء عليها .

ويساعد الساكن الطبيعي في الأنف والفم في منع التصاق الجراثيم الممرضة في بطانة الجهاز التنفسي مما يقلل من احتمالية الالتهابات .

وتعتبر التالية من أهم الأحياء الدقيقة التي يمكن أن توجد في البلعوم الأنفي Nasopharynx والبلعوم الفمي Oropharynx كساكن طبيعي :

السكن الطبيعي الذي يمكن أن يكون معرضاً Possible pathogens	السكن الطبيعي الذي نادراً ما يكون معرضاً Rarely Pathogens
Viridans streptococci Group A Beta -hemolytic streptococci Staph. aureus Streptococcus pneumonia Acintobacter Mycoplasma spp Haemophilus influenzae Corynebacterium diphtheriae Enterobacteriaceae Klebsiella ozaenae Peptostreptococcus spp Creptococcus neoformaus Filamentous Fungi Herpes simplex virns N.meningitidis Candida albicans H.para influenzae Moraxella: catarrhalis Pseudomonas spp Bacteroides spp Actinomyces spp Eikenella corrodens Vibrio spp Mycobacterium spp	Non hemolytic streptococci Micrococci Lactobacilli spp Coagulase-Negative staphylococci Staphylococcus spp Alpha hemolytic streptococci Viellonella Spirochetes Corynebacterium spp Neisseria spp ما عدا (N.meningitidis و (N.gonorrhoeae

أما الكائنات الدقيقة التالية فهي تعتبر كائنات دقيقة مرضية للجهاز التنفسي Respiratory tract pathogens حيث أن وجودها بأعداد قليلة أو كثيرة في الجهاز التنفسي ذو دلالة مرضية مهمة لقدرتها العالية على إحداث المرض وهي تقسم كما يلي .:

الأحياء الدقيقة الممرضة التي غالباً ما تسبب التهابات الجهاز التنفسي .

M .tuberculosis	Corynebacterium diphtheriae
Mycoplasma pneumoniae	Neisseria gonorrhoeae
Chlamydia pneumoniae	Chlamydia trachomatis
Coccidioides immitis	Bordetella pertussis
Histoplasma spp	Nocardia spp
Blastomyces dermatitides	Cryptococcus Neoformans
	Many type of virus

الكائنات الدقيقة الممرضة التي نادراً ما تسبب التهابات الجهاز التنفسي

Rare respiratory tract pathogens

Chlamydia psittaci	Francisella tularensis
Bacillus anthracis	Salmonella spp
Yersinia pestis	Coxiella burnetti
Klebsiella rhinoscleromatis	Pasteurella multocida
Pseudomonas pseudomallei	Parasites
Brucella spp	Varicella -Zoster virus

الباب الرابع

التهابات الجهاز التنفسي العلوي

Upper Respiratory tract infection

إن أكثر التهابات الجهاز التنفسي العلوي تظهر في منطقتي البلعوم الفمي والأنفي ويقل ظهور الالتهابات على جانبي التجويف الأنفي .

وتعتبر الفيروسات Viruses هي أكثر مسببات هذه الالتهابات إذ يبلغ نسبة الالتهابات الفيروسية حوالي 80% بينما تبلغ نسبة الالتهابات البكتيرية في البالغين حوالي 5-10% وفي الأطفال 15-20% ، من التهابات الجهاز التنفسي العلوي وتكون الالتهابات البكتيرية في الغالب تابعة لإصابة فيروسية أو تدني مناعة الشخص أو لأي سبب آخر قد يؤدي إلى تحطم النسيج الطلائي للتجويف الأنفي و الفمي كالتدخين مثلاً .

وتعتبر الأنواع البكتيرية التالية هي الأكثر شيوعاً كمسببات لالتهابات الجهاز التنفسي العلوي :

Streptococcus pyogenes (group A streptococcus)

β -hymolytic streptococci

Corynebacterium haemolyticum

بينما تعتبر التالية من الكائنات الدقيقة الممرضة و التي نادراً ما تسبب التهابات الجهاز التنفسي العلوي .

Corynebacterium diphtheriae

Neisseria gonorrhoeae

Bordetella pertussis

إذ تسبب الأولى مرض الدفتيريا أما الثانية فتسبب التهاب البلعوم وتسبب الأخيرة السعال الديكي Whooping cough .

وكما أسلفنا فإن الجهاز التنفسي العلوي يحتوي عدد كبير من الساكن الطبيعي مثل :-

Virdans streptococci

Beta-streptococci

Staphlococcus

anaerobic bacteria

Saprophitic Neisseria

Lactobacilli

Diphtheroids

Yeast

Haemophilus spp

أما في المرضى المقيمين في المستشفيات hospitalized patients فإن أفراد Enterobactriaceae وخاصةً Pseudomonas spp يمكن أن تصبح أكثر أفراد الساكن الطبيعي وجوداً في الجهاز التنفسي العلوي. وهناك بعض أنواع البكتيريا القادرة على إحداث التهابات في الجهاز التنفسي السفلي أو الإصابة الجهازية Systemic infection فإنها قد توجد في الجهاز التنفسي العلوي دون أن تحدث إصابة ويسمي الأشخاص الذين يملكون هذه الأنواع في أعلى جهازهم التنفسي بالأشخاص الناقلين للبكتيريا Carrier ومن الأمثلة على هذه الأنواع البكتيرية :-

Streptococcus pneumonia

H.influenzae type b

N.meningitidis

وقد تحدث مضاعفات عدة لالتهابات الجهاز التنفسي العلوي بسبب انتقال البكتيريا أو سمومها إلى أماكن أخرى من الجسم مثل التهابات الأذن الوسطى وتسمم الدم والتهاب المفاصل وأغشية القلب .

جمع وحفظ عينات الجهاز التنفسي العلوي Collection of URT specimens ،

يتم جمع العينات الدالة على التهاب الجهاز التنفسي العلوي من اللوزتين

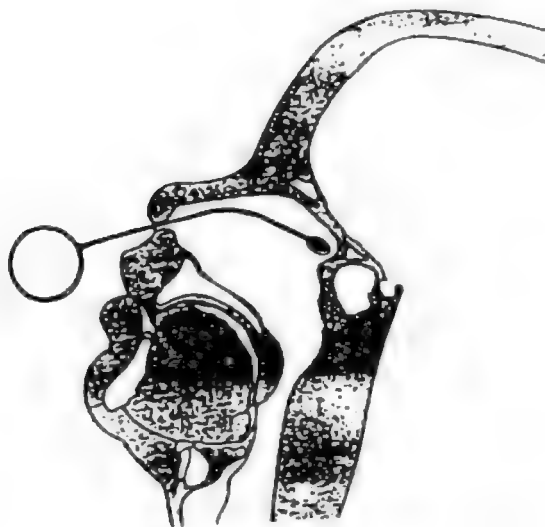
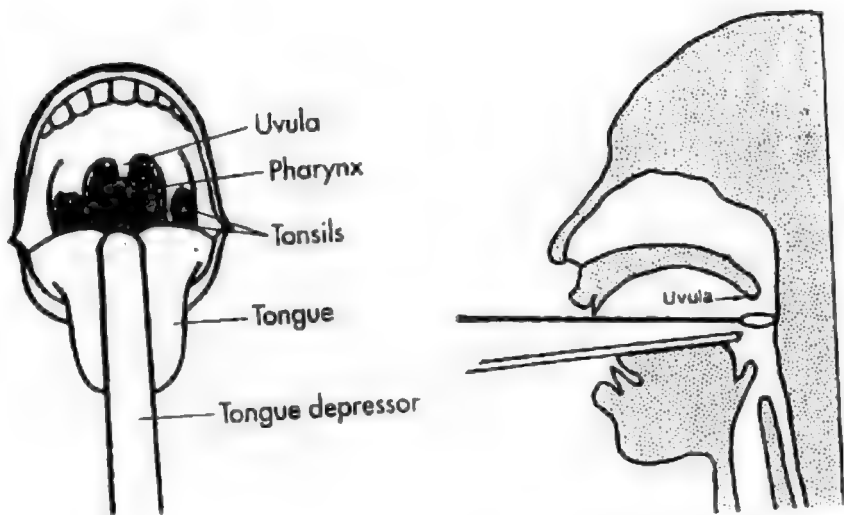
والجدار الخلفي للتجويف الفمي وتعتبر مسحة اللوزتين Throat swab هي العينة الأكثر شيوعاً لتشخيص هذه الإصابة.

إذ تستخدم ماسحة swab مغطاة بالقطن أو بملء الداكرون dacron أو بملء calcium alginate إلا أن الأخيرة تعتبر مادة سامة للكلاميديا Chlamydia ويتم اخذ المسحة بالطريقة التالية .:

- 1- إدارة وجه المريض باتجاه الضوء وجعل المريض يفتح فمه واسعاً .
 - 2- يتم ضغط اللسان إلى الأسفل بشدة باستخدام ضاغط اللسان tongue depressor.
 - 3- وباليد الأخرى تمرر ماسحة swab معقمة فوق اللسان باتجاه مكان الالتهاب دون أن تلامس اللسان أو تلامس أجزاء التجويف الفمي .
 - 4- يتم ضغط وتدوير الماسحة على اللوزتين أو في مكان الالتهاب أو التقرح .
 - 5- سحب الماسحة مع تجنب ملامسة اللسان أو الشفاه أو جدار الفم .
 - 6- فحص المسحة مباشرة وزراعتها على أوساط ملائمة أو وضعها في وسط نقل إذا لزم الأمر وذلك بإدخال الجزء الأمامي منها داخل الوسط مع كسر جزئها الخلفي ثم إغلاق الوسط .
- ويمكن أن تبقى الماسحة بما تحتويه من أحياء دقيقة على أفضل وجه وهي رطبة لمدة 4 ساعات من أخذها ما عدا group A streptococcus فهي تقاوم الجفاف وتبقى حية لمدة 48 ساعة على الماسحة swab .
- أما في حالات تعذر فحص المسحة أو زراعتها مباشرة يفضل وضع الماسحة كما أسلفنا في وسط نقل خاص مثل وسط Stuarts Transport media الذي يعتبر من أفضل أوساط النقل المستخدمة لمثل هذه العينات إذ يحافظ على حيوية الأحياء الدقيقة في العينة ويثبت نمو الجراثيم الملوثة لها وقد تستخدم أوساط أخرى مثل وسط Amies charcoal T.M. أو وسط CharCoal -blood T.M. التي تستخدم لنقل العينات لأوقات قليلة نسبياً.

كما يمكن وضع الماسحة وخاصة المأخوذة من التجويف الأنفي في أوساط تحتوي على البروتينات مثل وسط infusim broth ثم وضعها في الثلاجة دون تجميد للحفاظ. كذلك يمكن حفظ الماسحات swabs في الثلاجة على درجة 2-8 درجات مئوية لمدة 24 ساعة دون تجميد .

ويمكن أخذ العينات لتشخيص التهاب الجهاز التنفسي العلوي بطرق أخرى غير المسحات مثل عملية غسيل الأنف Nasal washing إذ يتم عمل غسيل للأنف بماء معقم وشفط السائل بواسطة أداة خاصة بذلك وتستخدم هذه العملية عادة في حالات الإصابة بالسعال الديكي Whooping cough وقد يتم استخدام ماسحة خاصة هنا تكون مرنة أو مائلة تدخل في الأنف حتى تلامس جدار البلعوم أو مكان اخذ العينة .



طريقة جمع عينات الجهاز التنفسي العلوي

الزراعة وعزل المسبب للالتهابات : Culture and Isolation

يتم التعامل مع عينات الجهاز التنفسي العلوي بطريقتين رئيسيتين هما :-

1- الفحص المجهرى Microscopic Examination

يعتبر الفحص المجهرى باستخدام تقنية الحقل المظلم أو الصبغ بصبغة غرام لا قيمة له إلا في الحالات التالية :

- استخدام تقنية الحقل المظلم في الكشف عن اللولبيات المسبة لمرض خناق فنسنت Vincents angina .

- استخدام التحضير الرطب مع 10% KOH للكشف عن الفطريات في العينة لمشاهدة الأبواغ والخيوط الفطرية خاصة فطر الكنديدا Candida وفطر Actenomyces كما أن الكشف بالفحص المجهرى المباشر عن وجود بعض العصيات أو المكورات الموجبة لصبغة غرام لا يمكن من خلاله تأكيد التشخيص وغالباً ما تؤدي إلى نتائج خاطئة إلا أن الفحص المجهرى المباشر قد يزودنا بمعلومات مهمة عن نوعية و كمية الجراثيم الموجودة في العينة بشكل طبيعي .

ويمكن الكشف عن وجود بعض الجراثيم في العينة مباشرة من خلال بعض الفحوصات المصلية Serology أو التآلقية المناعية Immuno florescent test التي يتم من خلالها الكشف عن الأجسام المضادة الخاصة بالنوع الجرثومي في العينة فمثلاً تبقى المسحة صالحة لمدة 24 ساعة للكشف عن انتيجينات بعض الفيروسات فيها مباشرة .

2- الزراعة والتشخيص Culture and diagnosis

تستخدم عدة أوساط لزراعة وتنمية الكائنات الدقيقة التي تسبب التهابات الجهاز التنفسي العلوي إذ يتم البحث عادة عن المسببات الرئيسية للالتهابات في العينة . ومن المهم مراقبة الساكن الطبيعي لهذا الجزء من الجسم لأن هذه المجموعة يمكن أن تنتهز حالة ضعف الجسم وتدني في مناعته لتكون سبباً في حدوث الإصابة

ويفضل تكرار الزراعة للتأكد من ذلك م وتكون عملية الزراعة والتشخيص كما يلي :

1- يعتبر وسط اجار الدم Blood Agar وسطاً روتينياً لزراعة عينات الجهاز التنفسي العلوي بحيث يحتوي على 5% كريات دم حمراء من الخراف sheep أو غيرها من الحيوانات حيث يساعد هذا الوسط على نمو أنواع متعددة من البكتيريا وخاصة بكتيريا Streptococcus المحللة للدم من نوع بيتا -β hemolytic و يمكن من خلاله أيضاً تمييز البكتيريا المحللة للدم عن غيرها من الأنواع .

وتتم الزراعة بعمل تخطيط واحد بالمسحة swab على الوسط ثم إكمال عملية التخطيط بواسطة الحلقة المعدنية loop ويحضان الوسط بعد ذلك على درجة 37 درجة مئوية لمدة يومين لملاحظة النمو ، ويمكن أيضاً استخدام وسط مفرق و خاص بزراعة مسحة اللوزتين Throat swab culture وهو عبارة عن وسط اجار الدم Blood agar مضاف له المضاد الحيوي sulfamethoxazole -trimethoprim (SXT) الذي يعمل على تثبيط ومنع نمو الساكن الطبيعي في التجويف الأنفي والفموي ويسمح فقط بنمو مجموعتي Streptococcus A+B.

ويمكن التعرف على مجموعة A وتفريقها عن مجموعة B من بكتيريا Streptococcus كما يلي .:

أ - زراعة العينة على وسط Blood agar لملاحظة مستعمرات صغيرة بيضاء محاطة بحلقة من تحلل الدم من نوع بيتا (β) وتكون سالبة لفحص Catalase .

ب- نشر مستعمرة مفردة على وسط آخر من Blood agar ثم وضع قرص من Bacitracin و SXT على الطبق وحضانة الوسط على درجة 35 درجة مئوية لمدة 24 ساعة إذ تعطي بكتيريا S. pyogenes (من مجموعة A Streptococcus) فقط حلقة تحلل (حساسية susceptibility) حول قرص Bacitracin بينما يظهر هذا النوع البكتيري مقاومة لقرص STX إذ يعتبر هذا الفحص مميّزاً لهذه المجموعة .

ج- إجراء فحص (PYR) Pyrrolidonyl arylamidase الذي يشابه في نتائجه فحص Bactracin إلا أنه أكثر تخصصاً إذ تعطي بكتيريا *S.pyogenens* وبعض أنواع بكتيريا *Beta -hemolytic Enterococci* نتيجة إيجابية لهذا الفحص .

د- ويستخدم بشكل شائع مجموعة من الفحوصات السريعة لتشخيص هذه المجموعة مثل فحص التخرثر Latex agglutination وفحص ELISA ويمكن استخدام فحص CAMP للتمييز بين مجموعة A و B من بكتيريا *Streptococcus* إذ تعطي المجموعة B نتيجة إيجابية لهذا الفحص .

2- ولزراعة وتشخيص مكورات السحايا *Meningococci* يمكن أن نحري ما يلي :
أ - زراعة العينة على وسط أجار الدم Blood agar ثم وضع الوسط في الحاضنة على درجة 35 درجة مئوية في ظروف لاهوائية أو في ظروف هوائية مع وجود 5-10% ثاني أكسيد الكربون

ب- يمكن زراعة العينة على وسط (MTM) Modified-Thayer-martin ويمكن أيضا زراعة العينة على وسط *chocolat agar* مضافاً له بعض المضادات الحيوية مثل *Vancomycin* الذي يعمل على تثبيط نمو البكتيريا الموجبة لصبغة غرام والعصيات السالبة لصبغة غرام ثم يحضن الوسط لمدة 48 ساعة على درجة حرارة 35-37 م°.

ج- ويتم إجراء بعض الفحوصات البيوكيميائية على المستعمرات النامية بعد ذلك إذ تعطي هذه البكتيريا نتيجة إيجابية لفحص *Oxidase* وتعمل على تخمير سكري الجلوكوز والمالتوز، ويمكن استخدام فحص التخرثر Latex agglutination أيضا للتعرف على هذه البكتيريا .

3- ولتنمية بكتيريا الدفتيريا *diphtheria* . C . تنزرع العينات على وسط مثل وسط *Loefflers slant* أو وسط *Cystein-tellurite agar* ويستخدم فحص *Elek tset* لتمييز بكتيريا الدفتيريا عن غيرها من أنواع البكتيريا استناداً على إفرازها للسموم .

4- ولتشخيص وزراعة البكتيريا المسؤولة عن السعال الديكي فيتم زراعة العينة على أوساط مثل وسط Regan Lowe charcoal agar أو وسط-Bordet Gengou media ويستخدم الفحص التألقي المناعي المباشر Direct Fluorescent antibody (DFA) test للكشف عن البكتيريا في العينة أو على الوسط مباشرة .

5- وتزرع العينة على وسط chocolate agar أو وسط اجار الدم Blood agar مضافاً إليه عاملي X و V ويحضان بوجود 5-10% CO₂ لتشخيص بكتيريا *Haemophilus* .

6- يمكن حقن أوساط مثل EMB و MacConkey بالعينة لعزل البكتيريا السالبة لصبغة غرام وعند توقع وجود الفطريات تحقن العينة في وسط SDA .

7- تزرع العينات لعزل الفيروسات أو الكلاميديا في مزارع نسيجية خاصة Tissus culture وتستخدم الفحوصات المصلية عادة لتشخيص الإصابة بالنوعين السابقين من الأحياء الدقيقة .

8- ولتحديد الأشخاص الناقلين للبكتيريا Carrier تؤخذ مسحة swab من الأنف وتزرع على عدة أوساط لتشخيص وجود البكتيريا محمولة في جهازهم التنفسي العلوي .

9- يجب إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية على نتيجة الزراعة وخاصة في حال نمو أحد الأنواع الممرضة على الأوساط الزراعية ويعتبر البنسلين Penicillin G افضل المضادات الحيوية لعلاج التهابات اللوزتين البكتيري يتبعه في ذلك الأنواع tetracycline أو Erythromycin أو Bacitracin .

الباب الخامس

التهابات الجهاز التنفسي السفلي

Lower Respiratory Tract infection

مقدمة ،

يتكون الجزء السفلي من الجهاز التنفسي من الرئتين Lungs والقضبات bronchi وقد تصاب هذه الأجزاء بالتهابات متعددة تسببها البكتيريا أو الفيروسات أو الفطريات أو غيرها من الأحياء الدقيقة. إذ يعتبر الجزء السفلي معقماً بسبب العوامل المناعية العامة الموجودة في الجهاز التنفسي العلوي والقضبات والتي تعمل على قتل ومنع الجراثيم من الدخول إلى الرئتين مع الهواء وهي كما أسلفنا سابقاً الشعيرات الأنفية و الإفرازات المخاطية والأهداب الموجودة في القضبات وكريات الدم البيضاء الملتزمة Macrophages بالإضافة إلى الأفعال المنعكسة مثل العطس والسعال جميعها تساعد في بقاء القضبات والرئة في حال معقمة .

إلا أن أي جرثومة تستطيع التغلب على العوامل المناعية السابقة وتخرقها وصولاً إلى الرئة قد تؤدي إلى التهابات متنوعة في القضبات Bronchitis أو في الرئة Pneumonia إذ أن أغلب مسببات التهابات الرئة والقضبات هي من الأنواع الموجودة في الجهاز التنفسي العلوي كساكن طبيعي و التي استطاعت المرور إلى أسفل الجهاز التنفسي وذلك نتيجة لتدني مناعة الشخص لأي سبب ممكن .

وقد تكون التهابات الجهاز التنفسي السفلي في الإنسان السليم ناتجة مباشرة من أنواع بكتيرية شديدة الأمراض لذلك تسمى Primary pneumonia أما الالتهابات البكتيرية الناتجة بعد التهابات فيروسية فتسمى Scondary pneumonia وقد ترتبط أنواع أخرى من البكتيريا بالتهابات لدى الأشخاص المصابين بأمراض تؤدي إلى تدني مناعة أجسامهم أو المرضى المقيمين في المستشفيات وسنذكر لاحقاً أهم الأنواع البكتيرية المسببة لالتهابات الجهاز التنفسي السفلي .

1- الأنواع البكتيرية المرتبطة بإصابة الأشخاص السليمين مباشرة
primary pneumonia والتي يؤدي وجودها بكميات قليلة إلى
حدوث الالتهاب .

Streptococcus pneumonia
Mycoplasma pneumonia
Chlamydia pneumonia
Mycobacterium tuberculosis
Legionella pneumophila

2- الأنواع البكتيرية المرتبطة بالتهابات الجهاز التنفسي السفلي والتابعة
علاقة بالتهاب فيروسي

Haemophilus influenzae
Staphylococcus aureus
Neisseria meningitidis
Moraxella catarrhalis
Fungi

3- أنواع البكتيرية التي تصيب الأشخاص منخفضي المناعة Immuno
compromised patient

Klebsiella pneumonia
Pseudomonas aeruginosa
Serratia spp
Staph.aureus
مجموعة
Enterobacteriaceae

جمع العينات Specimens Collection .1

يمكن اخذ علة عينات مناسبة للزراعة لتشخيص التهابات الجهاز التنفسي السفلي وهي :-

1- البلغم Sputum .1

يعتبر البلغم هو العينة الأكثر شيوعاً واستخداماً لتشخيص التهابات الجهاز التنفسي السفلي ويتم جمع العينة بالتنسيق مع المريض ليعطي العينة من أعماق الرئة بواسطة السعال العميق Deep cough ثم وضع العينة في عبوة معقمة .مع مراعاة عدم اختلاط البلغم باللعاب saliva حتى لا يتلوث بالسكان الطبيعي الموجود في الفم ، ويفضل اخذ عينة البلغم من المريض قبل تناول المضادات الحيوية وفي الصباح الباكر قبل الإفطار .اذ يتراوح حجم عينة البلغم المناسبة للزراعة ما بين 1-3 ملم حيث يفضل إعطاء 3-6 عينات خاصة في مرض السل لزيادة احتمالية عزل البكتيريا المسببة للمرض .

ويمكن حفظ العينة في الثلاجة أو نقلها في صندوق مبرد على درجة حرارة 2-8 درجات مئوية لفترة لا تزيد عن 3 ساعات ، اذ يفضل فحص وزراعة العينة مباشرة .

أما المرضى اللذين يصعب عليهم إعطاء البلغم فيتم إجراء معالجة تنفسية لهم بحيث يتم إعطاؤهم محلول ملحي فسيولوجي أو مادة مذيبة للمخاط مثل NaOH مع (NALC) N - acetyl - L -cysteine 20% لمدة 15 دقيقة بطريقة الاستنشاق والتي تساعد المريض على إعطاء البلغم وتعمل على التخلص من السكان الطبيعي البكتيري الملوث للعينة.

ويمكن اخذ العينة من الجهاز التنفسي السفلي بعدة طرق أخرى يتم من خلالها تجنب تلوث العينة بالسكان الطبيعي للجهاز التنفسي العلوي وهي كما يلي:

1- Endotracheal aspiration السحب من اسفل القصبات :

وتتم عملية السحب من اسفل القصبات عن طريق إدخال أنبوب مطاطي

إلى داخل القصبات وسحب الإفرازات الموجودة فيها من أجل زراعتها ، وتستخدم هذه الطريقة للحصول على العينة من الأطفال الصغار أو من المرضى غير القادرين على إعطاء العينة بواسطة السعال ، ويمكن إجراء غسل للقصبات Bronchial washings بواسطة كمية من المحلول الملحي Normal saline ثم سحب السائل الناتج والمختلط مع إفرازات القصبات من أجل الزراعة .

ب- غسل القصبات والحويصلات الهوائية (BAL) Bronchialveolar Lavage .

إذ تم هذه العملية بواسطة منظار خاص حيث يتم ضخ أكثر من 50 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي في أسفل القصبات ثم يجمع هذا المحلول مرة أخرى من أجل الزراعة .

ج- الخزعة أو السحب المباشر Direct Needle aspiration or Biopsy .

تستخدم هذه الطريقة لتجنب تلوث العينة بالساكن الطبيعي الموجود في الفم ولتشخيص الالتهابات البكتيرية اللاهوائية أو الانتهازية .

يمكن استخدام السائل المتأخذ من المعدة بواسطة عملية الشفط Gastric aspiration وخاصة في المواليد الجدد لتشخيص الإصابة بالسل إذ تكون البكتيريا قد نزلت إلى المعدة أثناء الليل ، لذلك يفضل أن تتم هذه العملية في الصباح الباكر .

فحص عينات الجهاز التنفسي السفلي Examination of L.R.T specimen

تخلط عينة البلغم مع 10% NaOH للتخلص من المخاط ثم تركز بعملية الطرد المركزي وبعد ذلك تفحص باتباع الخطوات التالية .:

1- الفحص الظاهري Macroscopic Examination :

في هذا الفحص يتم معرفة قوام ولون ورائحة العينة حيث يعطي دلالة تشخيصية معينة فمثلاً وجود الرائحة التنت للبلغم دلالة على وجود التفريجات الناتجة من بكتيريا لاهوائية ولون البلغم الأحمر دلالة على وجود الدم فيه .

2- الفحص المجهرى المباشر Direct Microscopic Examination .:

أ- التحضير الرطب Wet mount :

يتم عن طريق التحضير الرطب مشاهدة بعض الطفيليات أو الفطريات المسببة للالتهاب أو كريات الدم البيضاء القيحية Pus cells في العينة والتي تعتبر دليلاً على وجود الالتهاب .

ب- صبغة غرام Gram stain :

يتم إجراء صبغة غرام لمسحة Smear من عينة البلغم للتعرف على وجود البكتيريا وكريات الدم البيضاء والحمراء والخلايا الطلائية ، فعلى سبيل المثال عند ظهور بكتيريا كروية مزدوجة موجبة لصبغة غرام فان ذلك يدل على وجود بكتيريا Strep.pneumonia .

ويمكن من خلال المسحة المصبوغة بصبغة غرام التأكد من وجود الالتهاب ومن صحة العينة ويكون ذلك اعتماداً على نوع الخلايا الموجودة في المسحة وهي كالتالي :

- كريات الدم البيضاء متعددة الانوية PMN والتي تظهر في حالة وجود الالتهابات .

- خلايا طلائية حرشفية Squamous epithelial cells وهي خلايا تغلف التجويف الفمي ووجودها دليل على تلوث العينة باللعاب .

- خلايا طلائية عمادية مهدبة Ciliated columnar epithelial cells وهي خلايا تغلف القصبات الهوائية ووجودها دليل على التهاب في القصبات الهوائية .

ان وجود الخلايا الطلائية الحرشفية والبكتيريا فقط في المسحة المصبوغة ليس دليلاً أكيداً على الالتهاب بينما احتواء عينة البلغم على كريات دم حمراء وكريات دم بيضاء متعددة الانوية PMN وبكتيريا داخل الخلايا Intracellular bacteria فان هذا قد يدل على وجود التهاب الجهاز التنفسي السفلي .

وقد أشار بعض العلماء في دراساتهم على أن وجود اكثر من 10 خلايا طلائية في المسحة المصبوغة تحت القوة الكبرى للمجهر 100X يدل على تلوث

العينة باللعباب إذ ينصح برفض العينة ، أما إذا ظهرت أكثر من 25 كرية دم بيضاء واقل من 10 خلايا طلائية في حقل المجهر على القوة الصغرى 10X فانه دليل على الالتهاب ويتم تأكيد ذلك بعملية الزراعة .

ج- للكشف عن بكتيريا Strep.pnumonia في العينة مباشرة يتم إجراء فحص الانتفاخ Swelling Test.

د- تحضير مسحة وصبغها بصبغة Ziehl-Nleesen stain للكشف عن بكتيريا السل M.tuberculosis .

هـ - وفيد صبغ العينة بصبغة جساما Giemsa في الكشف عن بعض الفطريات مثل فطر Histoplasma .

و - إجراء بعض الفحوصات المصلية على عينة البلغم مباشرة مثل الفحوصات التالقية المناعية Immuno fluorescent assay أو فحوصات التخرش للكشف عن انتيجينات بعض أنواع البكتيريا مثل Mycoplasma أو Legionella أو Chlamydia .

الزراعة Culturing :

أ- تزرع عينة البلغم بشكل روتيني على الأوساط التالية Blood agar و Chocolate agar ويمكن أن تزرع على أوساط اختيارية مثل MacConkey agar و EMB إذ تم مشاهدة بكتيريا عسوية سالبة لصبغة غرام ، وتعتبر الأوساط السابقة مفيدة في عزل معظم البكتيريا الموجبة والسالبة لصبغة غرام .

ب- يستخدم وسط Lowenstein - Jensen agar كوسط مناسب لزراعة العينة التي يشتبه بوجود بكتيريا السل T.B. فيها إذ يتم خلط البلغم مع مادة NALC و NaOH لمدة 15 دقيقة إذ تعمل NaOH على إذابة المخاط في وتعمل مادة NALC على قتل الساكن الطبيعي للملوث للعينة دون أن يؤثر ذلك على بكتيريا السل ذات المقاومة العالية للأحماض ، ثم يتم تركيز العينة بمجهاز الطرد المركزي وزراعتها على الوسط المذكور سابقاً

ج- تزرع العينة المشتبه بوجود الفطريات فيها على أوساط مثل SDA أو (BHI) Brain-heart infusion agar .

ء- تزرع العينات المحتوية على الفيروسات والكلاميديا في المزارع النسيجية Tissue culture .

ويتم تشخيص الكائن المسبب للالتهاب عن طريق دراسة المستعمرات النامية على الوسط بواسطة اجراء صبغة غرام ، الفحوصات البيوكيميائية والفحوصات المصلية .

ويمكن التمييز بين S.pneumonia عن غيرها من أنواع Streptococcus بواسطة فحص Optochin إذ أن S.pneumonia تكون حساسة لهذا الفحص بينما الأنواع الأخرى من نفس البكتيريا تكون مقاومة له .

الباب السادس

السائل النخاعي الشوكي

Cerebral spinal fluid (CSF)

يتكون الجهاز العصبي المركزي CNS من الدماغ و الحبل الشوكي و الأغشية المحيطة بهما والتي تسمى السحايا meninges ويحاط هذا الجهاز بسائل يسمى السائل النخاعي الشوكي CSF الذي يتم إفرازه من الأوردة المحيطة بالدماغ إذ يفرز 95% منه من البطينات الدماغية الجانبية Ventricles ويتجه الى الفراغ تحت العنكبوتي Sub-archnoid space ليملأه ويحيط بذلك بالجهاز العصبي المركزي كاملاً ثم يعود الى الدم بشكل دورة مستمرة. ويعتبر السائل النخاعي الشوكي CSF سائلاً معقماً لا لون له ولا رائحة يبلغ حجمه في الإنسان البالغ ما بين 90-150 مل و في المواليد الجدد و الاطفال ما بين 10-60 مل . إذ يعمل بالتعاون مع أغشية السحايا على وقاية الجهاز العصبي المركزي من الصدمات والاحتكاك مع عظام الجمجمة والعمود الفقري كذلك يعمل CSF على إيصال العناصر الغذائية الى أنسجة الجهاز المركزي ويخلصها من الفضلات ويحتوي CSF على مواد كيميائية تختلف في تركيزها عن باقي سوائل الجسم . فمثلاً يكون تركيز السكر في CSF حوالي 60%-80% من تركيزه بالدم أي حوالي ثلثي تركيز السكر في الدم (والتي تساوي في العادة 45-85mg/dl) أما نسبة البروتين فيه فتتراوح بين 15-45mg/dl ويكون CSF في العادة خالياً من كريات الدم البيضاء وقد يحتوي أحياناً في الوضع الطبيعي على حوالي 1-6 كريات دم بيضاء لمفية Lymphocyte لكل مليمتر واحد من السائل .

التهاب السحايا Meningitis

تتعرض أغشية السحايا و النسيج العصبي المركزي إلى التهابات متعددة

نتيجة للعديد من الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا و الفيروسات و الفطريات بالإضافة إلى العديد من الطفيليات التي تنتقل عبر الدم من أماكن متعددة من الجسم إلى CSF ثم تصل أغشية السحايا أولاً وقد تصيب أجزاء أخرى من النسيج العصبي ونتيجة لقلة الخلايا الملتزمة phagocytes والأجسام المضادة في السائل النخاعي الشوكي تزداد فرصة انتقال الجراثيم من الدم إليه كنوع من الهروب من مناعة الجسم ومن أجل إيجاد مكان مناسب للتكاثر وتعتبر الأنواع البكتيرية المكونة للمحفظة capsule أكثر أنواع البكتيريا إحداثاً لالتهابات السحايا إذ تساعدها المحفظة على مقاومة عملية الالتهام Phagocytosis وتعتبر الالتهابات القريبة من الجهاز العصبي المركزي من أهم مصادر التهابات السحايا مثل التهابات اللوزتين و الأذن الوسطى .

ويقسم التهاب السحايا meningitis إلى نوعين : حاد acute ، ومزمن chronic حيث يرتبط التهاب السحايا البكتيري الحاد Acute Bacterial meningitis بأعراض مثل الحمى وآلم في الرأس وتقيؤ وشد عضلي في الرقبة وقد لا تظهر هذه الأعراض في الأطفال حديثي الولادة وقد تكون الأعراض على شكل ضعف وهبوط عام وتقيؤ وتشنجات عند بعضهم وتسبب الفيروسات التهاباً مشابهاً للالتهاب البكتيري من حيث الأعراض ويطلق على التهاب السحايا الفيروسي أو أي التهاب سحايا غير بكتيري اسم Aseptic meningitis .

وتعتبر التالية من أهم مسببات التهابات السحايا الحاد :-

المسببات البكتيرية	المسببات غير البكتيرية
N.meningitidis	Strongyloides stercoralis
Strep.pneumonia	Cryptococcus neoformans
Group B streptococcus	Virues
Listeria monocytogenes	Toxoplasma gondii
S.aureus	Naegleria
E.Coli and Gram (-ve) bacilli	Candida
Leptospira	E. histolytica
T.pallidum	
M.tuberculosis	

أما الأنواع التالية فقد عزلت من التهابات السحايا المزمنة Chronic.	
M.Tuberculosis	Actinomyces
C.Neoformans	Brucella
Coccidioides immitis	Shigella
Histoplasma capsulatum	Nocardia
Blastomyces dermatitidis	Toxoplasma gondii
Candida spp	Paragonimus westermani
T.pallidum	Trichinella spiralis

وتعتمد الإصابة بالتهاب السحايا البكتيري على عوامل عدة تساعد في حدوث الالتهاب وتحدد نوع المسبب وهذه العوامل هي :

- 1- التشوهات الخلقية التشريحية anatomical abnormalities .
 - 2- تدني المناعة بسبب الحالات المرضية .
 - 3- غياب الاجسام المضادة الخاصة ببعض الانواع البكتيرية مما يترك الشخص عرضة للأصابة وخاصة في الاطفال الذين لا تزيد أعمارهم عن خمسة أعوام .
 - 4- العمر age: نتيجة الدراسات المتعددة وجد ان هنالك انواعا معينة من البكتيريا تتكرر ضمن أعمار معينة وتكون هي المسبب الاكثر وجوداً في نتيجة الزراعة .
- فمثلاً تسبب الأنواع S.pneumonia و N.meningitidis و H.influenzae أكثر من 80% من حالات التهاب السحايا البكتيري عند الأطفال أما الجزء الباقي من الحالات 20% فتسببه أنواع أخرى من البكتيريا الانتهازية مثل L.monocytogenes والعصيات المعوية السالبة لصبغة غرام و Staphylococcus و Streptococcus spp وغيرها من أنواع البكتيريا .وقد صنفت المسببات الأكثر تكراراً بالارتباط مع العمر كما في الجدول التالي:

الأطفال والبالغين (أكبر من 5 سنوات)	الأطفال InFants (شهر الى 5سنوات)	المواليد الجدد Neonatal العمر: (أقل من شهر)
S. pneumonia N. meningitidis	S. pneumonia N. meningitidis H. influenzae Type b	Group B streptococcus E.cali L.monocytogenes Klebsiella spp Group D streptococcus

جمع ونقل العينات CSF : Collection and Transport of CSF

يعتبر السائل النخاعي الشوكي هو العينة المخبرية الرئيسية في تشخيص التهابات السحايا إذ تعطي مكوناته الخلوية والكيميائية دلائل مهمة على الإصابة .

وكما أسلفنا فإن السائل النخاعي الشوكي الطبيعي معقم وصافي وقد يحتوي على كريات دم بيضاء لمفية يتراوح عددها ما بين 1-6 خلايا لكل سنتيمتر مكعب منه. وتتغير مكونات CSF الكيميائية والخلوية مع التهاب السحايا ففي التهاب السحايا البكتيري الحاد مثلاً يصبح CSF متقيحاً purulent نتيجة لوجود عدد كبير من كريات الدم البيضاء ويرتفع تركيز البروتين ويقل تركيز السكر فيه .

ويتم جمع عينة CSF من قبل الطبيب المختص بواسطة عملية البزل Aspiration بإدخال ابرة خاصة بين الفقرتين القطنيتين الرابعة والخامسة (Lumbar puncture) حتى تصل الى السائل النخاعي لسحبه . وتتم هذه العملية تحت ظروف معقمة اذ يتم سحب 2-5 مل من CSF وتوزع على ثلاث أنابيب معقمة ونظيفة ومحكمة الأغلاق بمقدار (1-2) مل من CSF في كل أنبوب وترقم الأنابيب بالتتابع من 1-3 اعتماداً على عملية السحب . ليتم استخدام أحد الأنابيب من أجل الزراعة و الفحوصات الجرثومية Microbiology و الآخر للفحوصات الكيميائية Chemistry و الثالث من أجل القيام بفحوصات الدم (عد الخلايا) Hematology حيث يشترط أن لا يكون الأنبوب الأول هو المستخدم للزراعة وذلك لاحتمال تلوثه بالبكتيريا الموجودة كساكن طبيعي على الجلد أثناء بدء عملية السحب . و يفضل اجراء الفحوصات على عينة CSF بشكل مباشر خلال أقل من ساعة من أخذ العينة بسبب حساسية الجراثيم المسببة لالتهاب السحايا للهواء والبرودة خاصة بكتيريا Neisseria و Haemophilus . لذلك تحفظ عينة CSF على درجة حرارة الغرفة أو في الحاضنة على درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 2-3 ساعات فقط ولا تحفظ في الثلاجة . اما العينات التي تحتوي على الفيروسات فيمكن حفظها في الثلاجة لمدة 24 ساعة أو حفظها على درجة حرارة 70 تحت الصفر لفترات زمنية طويلة .

المراحل المتبعة في فحص السائل النخاعي الشوكي :

تمر عملية فحص السائل النخاعي الشوكي بعدة خطوات مهمة لتشخيص الكائن المسبب للتهاب السحايا وتعطي هذه الخطوات دلالات مهمة على نوع الالتهاب ويكون ذلك كما يلي .:

أولاً، الفحص الظاهري Macroscopic examination .:

يكون السائل النخاعي الشوكي في الحالة الطبيعية عديم اللون رائقاً وعند الإصابة بالتهاب السحايا فإن ذلك يتغير ويكون الفحص الظاهري بملاحظة ما يلي:

1- العكورة Turbidity .:

يصبح CSF عكراً نتيجة لوجود عدد كبير من كريات الدم البيضاء القيحية Pus cells فيه الذي يعتبر دليلاً على الإصابة إلا أنه قد يكون CSF رائقاً إذا تمت عملية السحب في مراحل مبكرة من الإصابة .

2- اللون Color .:

ظهور اللون الأحمر في العينة (لون الدم) دليل على نزف في الأغشية السحايا أو نزف دماغي أو نتيجة لتمزق أحد الأوعية الدموية الدقيقة أثناء عملية سحب السائل ، وعند ظهور اللون الأحمر في الأنبوب الأول فقط فهذا دليل على تمزق أحد الأوعية الدموية الدقيقة أثناء عملية سحب العينة أما إذا كانت شدة اللون في الانابيب الثلاثة متساوية فهذا دليل على النزف في الدماغ أو في أغشية السحايا إذ لا بد من ذكر ذلك في تقرير المختبر

وقد يظهر CSF بلون وردي وهذا دليل على وجود صبغة Xanthochromia الناتجة من تحلل الدم وخروج الهيموغلوبين من الكريات إذ يبدأ ظهور هذه الصبغة بعد حوالي أربع ساعات من بداية النزف و تبدأ بالاختفاء بعد 4-8 أيام منه ويجب الكشف عن هذه الصبغة في أقل من ساعة بعد أخذ العينة حتى لا يحدث تحلل لكريات الدم الحمراء التي قد توجد في العينة وبالتالي الحصول على نتيجة إيجابية خاطئة إذ أن ظهور الصبغة دليل على وجود النزف القديم نسبياً في منطقة الدماغ

أو اغشية السحايا . أما ظهور اللون الأصفر في عينة CSF فهو دليل على وجود مادة البليروبين Bilirubin الناتجة أيضاً من تحلل كريات الدم الحمراء والتي تظهر بعد حوالي 12 ساعة من النزف وتخففي بعد حوالي 2-4 أسابيع وقد يؤدي ارتفاع نسبة البروتين أكثر من 150mg/dl في العينة الى ظهور اللون الاصفر أيضاً .

3- ملاحظة وجود الجلطات clots والترسبات deposit :

قد تظهر التجلطات نتيجة لزيادة نسبة الفبرينوجين Fibrinogen في العينة أثناء سحبها وظهور الجلطات clots قد يترافق مع إنسداد التجويف تحت العنكبوتي Sub arachnoid space أو التهاب السحايا . ونتيجة لاحتواء الجلطات clots على كمية من البكتيريا وكريات الدم البيضاء ينصح بأخذ الجلطة ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة حتي تجف ، وبعد ذلك تخلط مرة أخرى مع سائل CSF ثم يتم ترسيب العينة بجهاز الطرد المركزي لاستخدام الراسب في التحضير الرطب أو المسحات المصبوغة فقط .

ثانياً الفحص المجهرى المباشر Direct Microscopic examination .،

يتم الفحص المجهرى لعينة CSF بعدة خطوات متسلسلة جميعها يساعد في تشخيص وتحديد نوع الإصابة وتكون هذه الخطوات كما يلي .:

1- عد الخلايا Cell count :

تعتبر عملية عد كريات الدم البيضاء من أسرع الفحوصات التي يجب إجراؤها على عينة CSF إذ يجب ان تتم بسرعة وفي وقت لا يتجاوز النصف ساعة من أخذ العينة بحيث تعطي عملية عد الخلايا مؤشراً على الإصابة وكما أسلفنا فإن CSF في الوضع الطبيعي يحتوي على أقل من ست خلايا لمفية لكل ملم واحد منه إلا أن زيادة العدد دليل على الإصابة بالتهاب السحايا كذلك فإن CSF الطبيعي لا يحتوي على أية كرية دم حمراء أيضاً . وتتم عملية العد باستخدام شريحة خاصة Chamber (نفسها المستخدمة لعد كريات الدم الحمراء والبيضاء في الدم) وذلك بأخذ جزء من سائل CSF مباشرة بعد تحريكه بلطف ووضعه على الشريحة ثم العد تحت المجهر وينصح بعدم عد الخلايا في عينة CSF آلياً .

2-تحضير المسحات Preperation of smear .:

يتم اجراء عملية الطرد المركزي على أحد الأنابيب المحتوية على العينة الطازجة لمدة 15 دقيقة على 300دورة بالدقيقة ثم فصل الجزء الطافي لاستخدامه في فحوصات اخرى وأخذ نقطة من الراسب ووضعها على شريحة زجاجية نظيفة دون نشر النقطة ثم تركها لتجف ثم صبغها ،أما في حالة كون العينة CSF عكرة فيمكن تحضير المسحة مباشرة دون عملية الطرد المركزي ويفضل تحضير عدة مسحات معاً من أجل عمل ما يلي .:

أ-العد التفريقي لكريات الدم البيضاء Differential cell count .:

إذا كان عدد كريات الدم البيضاء في عملية العد السابقة أكثر من 30 خلية يتم اللجوء الى عملية العد التفريقي من أجل تحديد النسبة المئوية لكريات الدم البيضاء في العينة بحيث يتم عد مئة كرية دم بيضاء ثم حساب النسبة المئوية لكل نوع منها تحت المجهر .

ويشير ارتفاع نسبة الكريات متعددة الأنوية Polynuclear cells الى الإصابة البكتيرية بينما يشير ارتفاع نسبة الكريات وحيدة النواة Mononuclear cells الى الإصابة الفيروسية .وتصبغ المسحة هنا بالصبغات الخاصة بالعد التفريقي مثل صبغة رايت Wright أو صبغة جمسا Geimsa .

ب-صبغة غرام Gram stain .:

تصبغ أحد الشرائح بصبغة غرام gram stain بأسرع وقت ليتم مشاهدة المسحة تحت العدسة الزيتية للمجهر Oil immersion ثم تزويد الطبيب بالنتيجة بسرعة بحيث تعتبر هذه النتيجة مبدئية ومؤكدة للإصابة البكتيرية إذ تظهر المكورات السحائية meningo cocci على شكل خلايا مزدوجة diplococci سالبة لصبغة غرام داخل خلوية intracellular وتظهر S.pneumonia بشكل الشفرة Lancet shape مزدوجة موجبة لصبغة غرام داخل وخارج خلايا الدم البيضاء أما ظهور عصيات صغيرة سالبة لصبغة غرام فقد تدل على بكتيريا H. influenzae أو أحد أفراد العائلة المعوية Enteric negative rods و تستخدم صبغة غرام للكشف عن

معظم أنواع البكتيريا الشائعة والمسببة لالتهاب السحايا ما عدا
L.monocytogenes.

ج- عمل مسحة مصبوعة بصبغة Ziehl-Neelsen stain :

يتم عمل هذه المسحة عند الشك بوجود بكتيريا M. Tuberculosis في
العينة إذ تعطي هذه المسحة نتيجة سريعة مقارنةً مع عملية الزراعة التي تأخذ مدة
زمنية طويلة.

د- عمل مسحة وصبغها بصبغة Methylene blue ::

تستخدم هذه الصبغة بسبب قابليتها الضعيفة على صبغ خلفية الجزيئات إذ
تعطي القدرة على المقارنة بين الأنواع البكتيرية الموجودة في العينة وبين خلفية
الشريحة back ground وأكثر ما تكون هذه الصبغة مفيدة في حالة وجود الأنواع
البكتيرية السالبة لصبغة غرام .

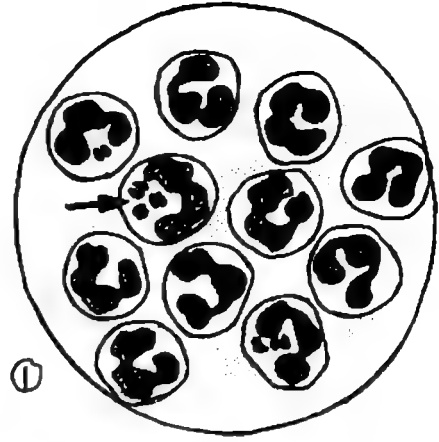
هـ- الصبغ بالصبغات التألقية Fluorochrom stain ::

تستخدم هنا الصبغات التألقية مثل auramin و Acridine orang rhodamine للحصول على نتائج سريعة بحيث يتم مشاهدة البكتيريا ان وجدت
تحت المجهر وعلى القوة الكبرى (X40) في العينة بمظهر متألّق واضح . وفي حالة
ظهور البكتيريا بهذه الصبغة يمكن صبغ نفس المسحة بصبغة غرام من أجل تمييز
أنواع البكتيريا الموجودة والتعرف عليها .

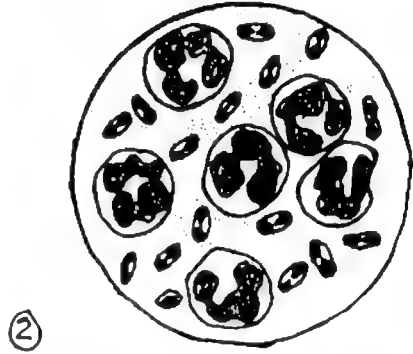
3- التحضير الرطب Wet mount ::

يتم عمل التحضير الرطب للراسب Sediment بالمحلول الملحي Normal
sline للكشف عن العديد من مسببات التهاب السحايا مثل طفيلي E.
histolytica ويمكن عمل التحضير الرطب بالحبر الهندي India-Ink عند الشك
بوجود فطر Cryptococcus بحيث تظهر خلايا الفطر شفافة متبرعمة على خلفية
معتمة .

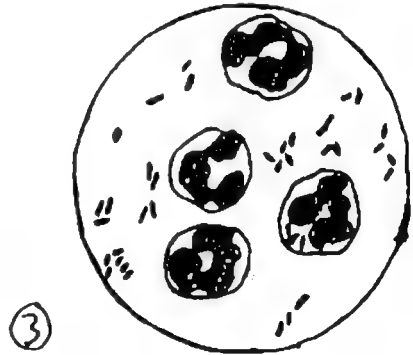
1- بكتيريا *N. meningitidis* خلايا
سالبة لصبغة غرام، كروية
مزدوجة توجد داخل وخارج
كريات الدم البيضاء.



2- بكتيريا *S. Pneumonia* خلايا
كروية مزدوجة، موجبة لصبغة
غرام، ملتصقة النهايات ومغطاة
بمحفظة.



3- بكتيريا *H. influenzae* خلايا
عصوية قصيرة سالبة لصبغة
غرام توجد في الغالب خارج
كريات الدم البيضاء.



أهم مسببات التهاب السحايا كما تظهر في مسحة مصبوعة لعينة CSF

ثالثاً. الفحوصات الكيميائية والمصلية Serological and Chemical test .

1- الفحوصات الكيميائية :

تتغير نتيجة لالتهاب السحايا قيم المكونات الكيميائية لسائل CSF إذ انه من المفيد التعرف على بعض القيم الكيميائية في CSF ومقارنتها مع القيم الطبيعية ونسب هذه المواد في الدم من أجل المساعدة في تشخيص نوع الإصابة . ومن الفحوصات الكيميائية التي يمكن إجراؤها على عينة CSF إيجاد نسبة السكر و البروتين وحمض اللاكتيك Lactic acid والغلوتامين glutamine وبين الجدول التالي مقارنة لأهم نسب مكونات CSF الخلوية والكيميائية بين الحالة الطبيعية وحالة التهاب السحايا اعتماداً على نوع المسبب .

نوع المص	عدد كريات الدم البيضاء لكل ملم مكعب leukocytes	نوع كريات الدم الأكثر وجوداً (السائدة)	تركيز السكر mg/dl Glucose	تركيز البروتين mg/dl protein	نتيجة الزراعة على الأوساط البروتينية
الحالة الطبيعية	صفر - 6	لمفية lymphocyte	45-85	15-45	سلبية
الكتير	6-20000	متعادلة Neutrophils	أقل من 45 (5-20)	أكثر من 50	إيجابية
الغريوات	100-1000	لمفية Lymphocyte	طبيعي	طبيعي أو مرتفع قليلاً	سلبية
M.Tuberculosis	25-500	لمفية Lymphocyte	أقل من 45 (20-40)	أكثر من 50	سلبية
الفطريات	صفر - 1000	لمفية Lymphocyte	أقل من 45	أكثر من 50	سلبية

2- الفحوصات المصلية :

تستخدم الفحوصات المصلية لتشخيص وتحديد مسبب التهاب السحايا الجرثومي بشكل سريع وعلى العينة مباشرة وهي كما يلي .:

أ- الكشف عن انتيجينات البكتيريا مباشرة في العينة Direct Detection of

: Bacterial Antigens

ويتم ذلك عن طريق فحص التخثر Latex agglutination باستخدام طقم (Kit) مكون من أجسام مضادة محضرة ومتخصصة للكشف عن انتيجينات المحفظة Capsular antigens للأنواع الشائعة من البكتيريا المسببة لالتهاب السحايا وهي E.coli Group B streptococcus N.meningitidis S.pneumonia H.influenzae typeb و يتكون الطقم kit من خمس عبوات كل عبوة تحتوي على أجسام مضادة ملتصقة بجزيئات latex خاصة بنوع واحد من البكتيريا إذ يتم خلط نقطة واحدة من أية عبوة مع نقطة من CSF بحيث تكون النتيجة الايجابية على شكل تخثر Agglutination وهذا دليل على وجود النوع البكتيري الذي يتم البحث عنه .

ب- فحص الإنتفاخ Quellung test :

الذي يستخدم للكشف عن وجود بكتيريا S.pneumonia في العينة مباشرة.

ج- فحص VDRL :

يستخدم للكشف عن الأجسام المضادة التي كونها الجسم نتيجة للاصابة ببكتيريا T.pallidum كذلك يمكن الكشف عن أي نوع من الأجسام المضادة بشكل غير مباشر في الدم والناجمة من الاصابة بأي نوع من الجراثيم بالطرق المصلية المتعددة .

د- استخدام تقنية الحقل المظلم Dark field technique

للكشف عن اللولبيات Spirochetes

ويتم اجراء فحص التخثر Latex agglutination للكشف أيضا عن فطر cryptococcus في العينة مباشرة .

هـ- يمكن الكشف عن انتيجينات أي نوع من مسببات التهاب السحايا في عينة CSF بواسطة مجموعة من الفحوصات المصلية مثل

1- الفحوصات التألقية Fluorescent Ab. techniques

2- الترحيل الكهربائي Immunoelectrophoresis

رابعاً. الزراعة Culturing .

يتم زراعة عينة CSF على أوساط متعددة لتوفير متطلبات النمو لأكبر عدد من البكتيريا التي قد توجد في العينة ويؤخذ الانبوب الثاني أو الثالث المحتوي على سائل CSF كما أسلفنا في ظروف معقمة ويجرى له عملية الطرد المركزي ثم يفصل الجزء الطافي ويحرك الراسب جيداً ويحقن عدة نقاط من الراسب في عدة أوساط كما يلي:

1- روتينياً تحقن العينة في وسطين معاً هما وسط آجار الدم Sheep Blood agar و وسط chocolate agar ثم تحضن الأطباق هوائياً مع توفير 5-10% CO₂ في درجة حرارة 37°م ويمكن وضع الأطباق في Candle Jar لتوفير كمية مناسبة من CO₂ وينصح بزراعة العينة لا هوائياً في حال كون سائل CSF يحتوي عدداً قليلاً من كريات الدم البيضاء . ثم يتم مراقبة النمو كل 24 ساعة لمدة 5-7 أيام و7-10 أيام للأطباق التي تحضن لا هوائياً قبل اعطاء النتيجة السلبية للنمو No Growth .

2- يزرع جزء من العينة لا هوائياً في Candle Jar في أوساط سائلة غنية مثل Thioglycollate broth أو Cooked meat broth مع عدم اغلاق اغطية الأنابيب بأحكام للسماح بتبادل الهواء مع البيئة المحيطة .

3- إذا تم مشاهدة عصيات سالبة لصبغة غرام G-ve bacilli في صبغة غرام ينصح بزراعة جزء من العينة على وسط MacConkey agar .

4- في التهاب السحايا الزمن وعند الشك بوجود بكتيريا السل M. tuberculosis ينصح بأخذ أربع عينات من المريض في أربعة ايام متتالية ثم أخذ الراسب من العينة وحقنة في وسط L.J.media وحضنة على درجة 37 درجة مئوية بوجود CO₂ لمدة 8 أسابيع .

5- للكشف عن الفطريات يحقن جزء من الراسب في أوساط مثل وسط SDA و وسط Brain heart infusion مضافاً إليها بعض المضادات الحيوية .

6- يتم زراعة العينات المحتوية على الفيروسات في المزارع النسيجية Tissue culture .

7- يتم عمل فحص التحسس الجرثومي للمضادات الحيوية Sensetive test لأي نمو يظهر على الأطباق بعد فترة الحضانة .

الباب السابع

زراعة الدم Blood culture

مقدمة ،

يعتبر الدم في الوضع الطبيعي سائلاً جسيماً معقماً إلا أن أعداداً من البكتيريا الحية قد تظهر فيه في بعض الحالات وهذا ما يسمى بتجرثم الدم Bacteremia وقد تدخل أعداد قليلة من البكتيريا أحياناً إلى الدم والتي تكون موجودة كساكن طبيعي في الجهاز التنفسي أو الهضمي ليتم القضاء على هذا العدد القليل بواسطة الخلايا الملتزمة Macrophages والكبد Liver والطحال Spleen أما إذا كان عدد البكتيريا الداخلة إلى الدم كبيراً فإن مناعة الجسم لا تتمكن من إزالة هذا العدد من البكتيريا فيحدث تجرثم الدم Bacteremia ويمكن أن يكون تجرثم الدم على ثلاثة وجوه هي :-

أ- تجرثم الدم العابر Transient Bacteremia ،

يحدث هذا النوع نتيجة لمرور الجراثيم عبر الدم لفترة زمنية قصيرة ويكون مصدر هذه الجراثيم من خارج الأوعية الدموية Extravascular source إذ أن بعض أنواع الساكن الطبيعي الموجودة على الأغشية المخاطية للجسم تستطيع دخول مجرى الدم نتيجة لتحطيم الشعيرات الدموية القريبة منها فتؤدي أدوات إصلاح الأسنان أو قرحة الأمعاء إلى دخول الساكن الطبيعي الموجود في هذه المناطق إلى الدم ويكون هذا النوع من تجرثم الدم في الغالب بدون أعراض .

ب- تجرثم الدم المتكرر Intermittent Bacteremia ،

يكون مصدر هذا النوع من خارج الأوعية الدموية وخاصة من العقد اللمفية إذ يتم إفراز الجراثيم إلى مجرى الدم نتيجة لتجمع عدد كبير منها في العقد اللمفية وتكون هذه الحالة غالباً متصاحبة مع أعراض تبدأ بالشعيرية المفاجئة وارتفاع درجة

الحرارة وتعتبر التهابات المسالك البولية والجهاز التنفسي السفلي (Pneumonia)
والتهابات الجروح من أهم مصادر هذا النوع من تجرثم الدم.
ج- تجرثم الدم المستمر Continuous bacteremia،

تعتبر الالتهابات داخل الأوعية Intravascular infection هي المصدر الرئيسي لهذا النوع من تجرثم الدم إذ أن هذه الالتهابات تزود الدم بالجراثيم باستمرار ومن الأمثلة المهمة على التهابات داخل الأوعية التهاب غشاء القلب الداخلي (شغاف القلب) Endocarditis والتهابات صمامات القلب والتي قد تنتج من البكتيريا التالية :

Enterococcus spp Viridans streptococci
S.aureus Strep.group D
S.epidermidis

أيضاً ومن الأمثلة المهمة على هذا النوع من تجرثم الدم هو الالتهاب المرافق مع انبوب القسطرة Catheter-associated infection وهو عبارة أنبوب مطاطي يتم ادخاله في اوريد بعض المرضى من اجل اعطاء الدواء او الدم لهم إذ قد يسبب هذا الأنبوب دخول الجراثيم الموجودة على الجلد معه لتؤدي الى تجرثم الدم وأهم هذه الجراثيم هي:

Klebsiella spp	S. epidermidis
Bacillus spp	S. aureas
Corynebacterium jeikeium	Dephtheroids
Enterobacter spp	

ومن الجدير بالذكر أن معظم حالات تجرثم الدم تكون متنوعة بحالة تسمم الدم Septicemia ويعني هذا المصطلح وجود سموم Toxin أو مركبات البكتيريا في الدم الذي يترافق مع قشعريرة مفاجئة وارتفاع في حرارة الجسم وزيادة في نبضات القلب وقد يؤدي إلى صدمة Septic shock وموت للمريض ، وبسبب ظهور تسمم الدم الذي قد يؤدي إلى الوفاة يلجأ الطبيب إلى زراعة الدم لعزل المسبب من

أجل إعطاء المضادات الحيوية مباشرة للمريض كذلك يلجأ الأطباء إلى زراعة الدم للمواليد الجدد Newborn عند الشك بتجرثم الدم لديهم مع أن المواليد الجدد تختفي لديهم الأعراض المثالية لتجرثم الدم فتكون عملية زراعة الدم وإعطاء المضاد الحيوي عبارة عن عملية وقاية وعلاج في آن واحد . ولقد وجد أن البكتيريا المسببة لتجرثم وتسمم الدم تدخل إلى الدم من المناطق الجسمية التالية وبالنسب الميئة أدناه .:

25% من القناة البولية التناسلية .

20% من القناة التنفسية .

10% من التقيحات Abscesses .

5% من التهابات الجروح الناتجة بعد العمليات الجراحية .

5% من القناة الصفراوية .

35% من مواقع وأسباب أخرى .

و يطلق مصطلح Fungemia على حالة وجود الفطريات في الدم والتي غالباً ما تظهر عند الأشخاص ذوي المناعة المتدنية ويعتبر فطر C.albicans أكثر أنواع الفطريات شيوعاً في هذه الحالة . وتعتبر الأنواع البكتيرية التالية هي الأكثر شيوعاً في حالات تسبب تجرثم الدم والتي عزلت بواسطة مزارع الدم:

أ- مسببات تجرثم الدم عند البالغين Adult bacteremia	
S. pneumonia	Pseudomonas
E. coli	N.meningitidis
Klebsilla	H.influnzae
Enterobacter	C.perfringens
Proteus	Bacteroides
Serratia	

ب- مسببات تجرثم الدم لدى المواليد الجدد :

E.coli , Group B streptococcus , L.monocytogenes

ج- مسببات التهاب غشاء القلب الداخلي (شغاف القلب) Endocarditis :

Viridans streptococci

Group D streptococcus

S. epidermidis

Pseudomonas aeruginosa

S.aureus

د- مسببات تجرثم الدم المترافق من أنابيب القسطرة Catheter - associated infections	
S epidermidis S.aureus .Diphtheroids	Corynebacterium Jeikeium Klebsiella Enterobacter Bacillus spp

هـ- المسببات الأخرى لتجرثم الدم	
Beta-henolytic streptococci Salmonella Anaerobes Campylobacter Mycoplasma Brucella Actinobacter	Xanthomonas Leptospira Candida spp H.capsulatum Nocardia Cryptococcus

وقد ذكر كتاب Microbiology and infections disease لمؤلفة (Gabriel

Virella) الطبعة الثالثة أن نسب تكرر مجموعات البكتيريا المعزولة في مزارع الدم كما يلي .:

1- البكتيريا الكروية الموجبة لصبغة غرام حوالي 31-41 %

- 2- البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة غرام حوالي 1%
- 3- البكتيريا العصوية السالبة لصبغة غرام حوالي 47- 61 %
- 4- الأنواع اللاهوائية حوالي 2-17%
- 5- الفطريات 2-12 % من مجمل الحالات .

• جمع عينة الدم Collection of Blood specimen

تعتبر زراعة الدم هي الطريقة الوحيدة والمهمة لتشخيص الإصابات البكتيرية الجهازية Systemic infection إذ تستخدم عينة الدم Blood من أجل تحديد مسببات تجرثم الدم Bacteremia حيث أن هذه المسببات لا توجد بصورة دائمة في الدم وإنما توجد في أوقات معينة وتكون عانة قليلة العدد ونادرة الوجود ولأجل الحصول على نتائج دقيقة وصحيحة ولنجاح عملية زراعة الدم يجب مراعاة الأمور التالية خلال عملية جمع عينة الدم .:

1- مراعاة ظروف التعقيم الجيد من كل مراحل العمل .

تعتبر عملية تلوث العينة بالسكان الطبيعي الموجود على الجلد Skin Normal Flora من أهم المشاكل التي تواجه عملية زراعة الدم إذ تؤدي إلى الحصول على نتائج إيجابية خاطئة وذلك لأن التهاب شغاف القلب Endocarditis . التهابات المترافقة مع أنبوب القسطرة Catheter associated infection تنتج من نفس الأنواع البكتيرية الموجودة على الجلد لذا يتوجب على الفني مراعاة كافة ظروف التعقيم اللازمة لتلافي هذا الالتباس في نتائج الزراعة والتي تتضمن ما يلي:

- أ - استخدام أوعية وأدوات جمع معقمة ومراعاة التعقيم الشديد في كافة خطوات العمل مثل استخدام إبر وسرنجات Syringes معقمة كذلك تعقيم فوهة عبوة الوسط الزراعي قبل عملية الزراعة وإجراء عملية الزراعة في ظروف معقمة .

- ب- تحديد الوريد المراد سحب الدم منه وتعقيم الجلد بشكل جيد يضمن القضاء على السكان الطبيعي الموجود في مكان السحب بشكل جيد ويتم ذلك بالطريقة التالية :

* ارتداء القفازات gloves المعقمة .

* مسح منطقة سحب الدم بشكل جيد بالكحول 70% .

* مسح منطقة سحب الدم باليود Iodine 2% وتركه لمدة دقيقة واحدة ويمكن استخدام مركب Chlorhexidine gluconate لتعقيم أيدي الأشخاص الذين لديهم تحسس لمادة اليود .

* إزالة اليود المتبقي بقطنة تحتوي على الكحول .

سحب الدم تحت ظروف معقمة ثم نقل الدم إلى عبوة الزراعة Blood culture مباشرة وبأسرع وقت ممكن مع مراعاة عدم لمس منطقة سحب الدم باليد قبل عملية السحب .

2- يفضل أخذ العينة قبل تناول المضادات الحيوية أما في الحالات الطارئة والملحة فيتم إضافة مواد كيميائية معطمة للمضادات الحيوية إلى العينة مثل Penicillinase المحطم للبنسلين .بالإضافة إلى ذلك فإن بعض مكونات المزارع البكتيرية قد تؤدي إلى معادلة بعض أنواع المضادات الحيوية إن وجدت مع الدم.

3- وقت أخذ العينة Time of Blood Collection :

ان وقت اخذ عينة الدم ليس من الأمور المهمة جداً في عملية الزراعة إلا انه يوصي بمراعاة الوقت في الحالات التالية :

أ- يفضل سحب العينة قبل تناول المضادات الحيوية كما أسلفنا .

ب- يفضل سحب العينة أثناء أو بعد نوبات القشعريرة و الحمى .

ج- يفضل أيضاً سحب العينة اعتماداً على أطوار المرض Stage of disease لذا إذ تكثر البكتيريا في الدم أثناء الطور الحاد للمرضى Chronic stage لذا يفضل أخذ عينة الدم في الأيام الأولى للإصابة ببعض الأمراض مثل التيفوئيد Typhoid لأنه وبعد مرور وقت من الإصابة فإن عدد البكتيريا في الدم يقل وتعمل الأجسام المضادة المتكونة في دم المريض على منع وتثبيط نمو البكتيريا في المزارع البكتيرية .

د- بسبب اختلاف عدد البكتيريا من وقت إلى آخر في نفس الشخص يفضل أخذ عدة عينات للزراعة بين كل عينة وأخرى 1-3 ساعات أو على عدة أيام متتالية كما في حالة الإصابة بالحمى المالطية والتهاب (شغاف القلب) Endocarditis .

هـ- أما في الأشخاص المتعاطين للمضادات الحيوية فيفضل أخذ عيتين في نفس الوقت ومن مكانين مختلفين من الجسم .

4- حجم عينة الدم المطلوبة : Volum of specimen

يعتبر حجم عينة الدم المأخوذ من المريض من العوامل المهمة في نجاح عملية الزراعة إذ انه كلما كانت كمية الدم أكبر وضمن الحد المطلوب زاد ذلك من فرصة العثور على الكائن المسبب لتجرثم الدم . وقد أشارت جميع المراجع الخاصة بذلك أن عينة الدم المأخوذة للزراعة من الأشخاص البالغين يجب أن تكون ما بين 10-20 مليلتر وتسحب بإبرة وحقنة معقمتين حيث أن حجم الدم للزراعة يجب أن لا يقل عن 10 مليلتر بينما افضل حجم من الدم للزراعة يؤخذ من الأطفال حديثي الولادة من 1-2 مليلتر ومن الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين شهر -6 سنوات هي 2,4-5 مليلتر من الدم لكل عبوة زراعة . أما في حال عدم التمكن من عمل عدة زراعات للدم لأسباب مثل الحاجة الماسة للمعالجة واختصار الوقت يفضل سحب 40 . للتر من الدم في وقت واحد تسحب كل 20 مليلتر منها من مكان منفصل من الجسم بإبرة وحقنة منفصلة ثم تزرع وتعامل كل 20 مليلتر كعينة منفصلة .

5- عدد عينات الدم اللازمة للزراعة : Number of blood culture

يساعد عدد عينات الدم المأخوذة للزراعة في زيادة فرصة العثور على الكائن المسبب لتجرثم الدم حيث أشارت الدراسات العلمية في هذا المجال أن اخذ عينة واحدة من الدم قادر على الكشف عن 80% من حالات تجرثم الدم بينما يكون اخذ ثلاث عينات من الدم خلال 24 ساعة قادراً على الكشف عن 99% من حالات تجرثم الدم بشرط أن تكون العينات من أماكن مختلفة من الجسم وبأوقات متباعدة وتزرع كل عينة في عبوتين أحدهما تحضن في ظروف هوائية وأخرى في

ظروف لا هوائية وقد أشارت بعض المراجع أن الأطفال الصغار يكفي أخذ عينة واحدة فقط من الدم للكشف عن تحرثم الدم لديهم لأن عدد الجراثيم في دم الأطفال الصغار يكون مرتفعاً أكبر من البالغين وذلك بسبب صغر حجم الجسم وقلة المقاومة لديهم .

وينصح بأخذ 3 عينات تزرع في 6 عبوات لتشخيص التهاب الغشاء الداخلي للقلب Endocarditis وذلك بسبب انخفاض الجراثيم الموجودة في الدم في هذه الحالة ولأن مسببات هذا الالتهاب هي من الجراثيم الموجودة كساكن طبيعي على جلد الإنسان والشائعة كملوثات لمزارع الدم حيث يمكن من خلال تعدد العينات التمييز بين الإصابة الحقيقية وبين تلوث العينة بهذه الجراثيم . أما في حالة عدم التمكن من أخذ علة عينات دم للزراعة ينصح بأخذ 40 ملليتر من الدم كل 20 ملليتر تؤخذ من مكان منفصل وبأدوات سحب منفصلة وتزرع أيضاً في عبوة منفصلة عن الأخرى كما بينا سابقاً .

يفضل زراعة عينة الدم بعد أخذها من المريض في العبوة المخصصة للزراعة مباشرة مع مراعاة ظروف التعقيم جيداً . ومن ثم نقل العينة إلى المختبر ووضعها في الحاضنة بسرعة ويجب عدم حفظ عبوة الزراعة المحتوية على الدم في الثلاجة بل وضعها في الحاضنة مباشرة .

مزارع الدم Blood Culture

تتميز عبوات مزارع الدم بمكونات شاملة تمكنها من أداء وظيفتها بنجاح إذ تضمن المواد المكونة لهذه المزارع الاحتياجات الغذائية العامة لنمو معظم الأحياء الدقيقة المتوقع وجودها في الدم كذلك تضمن تثبيط وسائل مناعة الجسم التي توجد في عينة الدم وبذلك فهي تضمن ظروفًا مناسبة للحصول على نتائج زراعة جيدة .

مكونات عبوة زراعة الدم .

(1) 50-100 ملليتر من الوسط السائل Nutrient broth و المكون من عدة أوساط مثل :

Trypticase soy broth

Brain heart infusion broth

Thioglycolate broth

Pepton water

broth Brucella

وفي بعض الحالات يتم إضافة المواد التالية إلى مزارع الدم وهي :-

أ- 10 % سكروز Sucrose من أجل تنشيط نمو أنواع معينة من البكتيريا مثل بعض العصيات السالبة لصبغة غرام .

ب- Penicillinase من أجل تحطيم البنسلين عند الأشخاص المتعاطين لهذه المضاد الحيوي والسماح بحرية النمو للبكتيريا .

ج- مواد تعمل على معادلة وإزالة الأجسام المضادة Antibody في الدم وتسمى Resins . ومن الجدير بالذكر انه يجب أن لا يكون وسط زراعة الدم اختيارياً Selective وذلك من أجل السماح بنمو كل أنواع البكتيريا المتوقع وجودها في الدم بشكل طبيعي ومتوازن .

2) كذلك تحتوي عبوة زراعة الدم على مادة مانعة للتجلط Anticoagulant من أجل منع تجلط عينة الدم التي بدورها قد تمنع نمو الجراثيم على المزرعة .

ومن موانع التجلط التي تستخدم في مزارع الدم هي EDTA و Citrate و Heparin و Oxalate حيث وجد إن كل السابقة ذات تأثير سام على بعض أنواع البكتيريا . وقد وجد إن انصب مانع تجلط يفضل استخدامه في مزارع الدم هو Sodium Polyanethol Sulfonate (SPS) الذي يسمى Liquoid بتركيز (0.05%) وذلك لأنه :-

أ- يثبط عمل النظام المضاد للجراثيم في دم الإنسان والمتمثل بعملية البلعمة Phagocytosis والأجسام المضادة Antibodies ونظام المتمم Complements .

ب- ثابت في درجة الحرارة Autoclave .

ج- يعمل على تثبيط عمل بعض المضادات الحيوية مثل Gentamycin و Streptomycin و Polymyxin B

مع وجود بعض المساوي لهذا المركب مثل تثبيط نمو بعض المكورات الموجبة لصبغة غرام Gram positive cocci و بكتيريا Neisseria و بكتيريا Gardnerella vaginalis حيث ينصح بإضافة 1-2 من مادة الجلاتين gelatin لمعادلة التأثير السلبي لمادة SPS .

تخفيف الدم (حجم الدم بالنسبة للسائل في المزرعة)

Dilution of Blood (Volume of blood to broth)

تحتوي عينة الدم المخفوفة للزراعة على عوامل قاتلة للجراثيم مثل الأجسام المضادة والخلايا الملتزمة Phagocytes وبروتينات المتم Complements بالإضافة إلى احتمالية وجود أدوية ومضادات حيوية وهذا قد يؤدي إلى قتل وتحليل الجراثيم المسببة لتجثر الدم فيها لذلك يتم اللجوء إلى تخفيف العينة بنسبة كافية لمعادلة تأثير العوامل القاتلة للجراثيم وفي الجهة المقابلة إعطاء فرصة مناسبة لنمو الجراثيم. وقد وجد إن أقل تخفيف يجب استخدامه في مزارع الدم هو بنسبة (10:1) حجم واحد من الدم إلى عشرة أحجام من الوسط السائل Broth .

ملاحظة:

يفضل حقن عينة الدم في عبوة الزراعة مباشرة وإذا تطلب الأمر يمكن حفظ عينة الدم مخلوطة مع مادة مانعة للتخثر في الثلاجة لوقت لا يتجاوز الساعتين .
يفضل ترك عبوة زراعة الدم تأخذ درجة حرارة الغرفة قبل حقن عينة الدم فيها إذا كانت محفوظة في الثلاجة أصلاً .

الزراعة ومراقبة النمو Culturing and examination of growth

كما أسلفنا نزرع عينة الدم مباشرة في عبوة خاصة تحتوي وسط زراعة الدم ويفضل حقن كل (10 مل) من الدم في عبوة زراعة خاصة بحيث يتم زراعة عبوتين تحضن إحدهما في ظروف هوائية والأخرى في ظروف لا هوائية على درجة حرارة

37 درجة مئوية. وبما أن عبوة زراعة الدم محضرة بطريقة توفر في داخلها جواً يحوي على نسبة من ثاني أكسيد الكربون الذي يناسب نمو معظم أنواع البكتيريا ولكن هذا الجوا لا يساعد في نمو الأحياء الهوائية الإجبارية مثل *Pseudomonas* و *yeast* و *Acinetobacter* لذا يفضل السماح لكمية من الهواء بالدخول إلى عبوة الزراعة وذلك بإدخال إبرة معقمة عبر غطاء العبوة تكون الإبرة مغطاة بالقطن من الأعلى وهذا يساعد في دخول الهواء الذي يناسب نمو الأنواع السابقة . ويراقب النمو في مزرعة الدم *Blood culture* خلال الأسبوع الأول من الحضانة يومياً لأن معظم أنواع البكتيريا المسببة لتجرثم الدم تنمو خلال 6-18 ساعة من زراعتها إن وجدت وتتم عملية المراقبة كما يلي .:

أ- بعد 6-18 ساعة من الحضانة : يتم مراقبة علامات ودلائل نمو الأحياء الدقيقة في المزرعة بالعين المجردة إذ يكون النمو على شكل تغيرات في طبيعة الوسط وهذه التغيرات قد تظهر بشكل عكورة أو تحلل كريات الدم الحمراء أو ظهور فقاعات من الغاز أو مستعمرات صغيرة منتشرة في الوسط السائل أو قد يشكل النمو طبقة تترسب على سطح كريات الدم الحمراء وقد تظهر مستعمرات بكتيرية واضحة على السطح الأجار الصلب في المزارع ثنائية الوجه *Diphase media* (أي التي تحتوي على وسط سائل *broth* ووسط صلب *Nutrient agar* معاً) وفي حال ظهور النمو يجب عمل صبغة غرام لمسحة *smear* من الوسط بعد تحريكه جيداً وكذلك عمل زراعة *subculture* على وسط صلب لتأكيد وجود النمو الجرثومي إلا إن ظهور العكورة في الوسط ليس دليلاً أكيداً على وجود النمو الجرثومي فيه وذلك لأن تحلل كريات الدم الحمراء وتكون خيوط الفايبرين *Fibrin* نتيجة لطول فترة الحضانة يؤدي إلى ظهور عكورة في الوسط السائل وهذا ما يتم تمييزه بواسطة صبغة غرام .

ب- خلال 12-24 ساعة وفي حال عدم ظهور أي دلائل أو إشارات للنمو الجرثومي في المزرعة : يتم عمل زراعة عشوائياً *Blind subculture* على وسط *Chocolate agar* الذي يوضع في الحضانة لمدة 48 ساعة بوجود 5-10% CO_2 على درجة

حرارة 37 درجة مئوية ثم يتم مراقبة ظهور النمو . وتعتبر هذه الزراعة العشوائية Blind subculture مفيدة لأن بعض أنواع البكتيريا مثل Neisseria و H.influenzae و S.pneumonia لا يؤدي نموها إلى ظهور العكورة في الوسط كما وتنتج الأخيرة أيضاً أنزيمات محللة تؤدي إلى تحلل خلاياها مع طول فترة الحضانة لذا تكون الزراعة العشوائية مفيدة في تشخيص وجود الأنواع البكتيرية السابقة. بينما لا تعتبر الزراعة اللاهوائية العشوائية Blind anaerobic sub culture ضرورية لأن نمو البكتيريا اللاهوائية غالباً يؤدي إلى ظهور العكورة في الوسط . وفي حال عدم ظهور النمو هنا أيضاً يجب إعطاء الطبيب تقريراً مبدئياً عن عدم وجود النمو البكتيري حتى ذلك الوقت .

ج- وبعد ذلك وخلال 2-7 أيام يتم مراقبة ظهور دلالات النمو في الوسط يومياً ثم يعطى تقرير نهائي إذا لم يظهر النمو بعد اسبوع من الحضانة .

د- وفي حال بقاء نتيجة الزراعة سلبية لعدم ظهور النمو في مزرعة الدم تترك الأوساط في الحاضنة لمدة أسبوعين آخرين ويراقب النمو بأوقات متباعدة حيث إن بعض أنواع البكتيريا المسببة لالتهاب شغاف القلب أو الحمى المالطية وخاصة الأنواع Brucella و Yeast و Francisella تحتاج لفترة حضانة تقارب الشهر بسبب نموها البطيء، ويتم إعطاء نتيجة زراعة سلبية No Growth والتخلص من مزارع الدم بعد ثلاثة أسابيع من الحضانة في حال استمرار عدم ظهور النمو الجرثومي في المزرعة .

خطوات التعامل مع مزارع الدم الإيجابية (ظهور النمو)

Handling of positive blood culture:

إن ظهور النمو في مزرعة الدم يتطلب اتباع مجموعة من الخطوات من أجل الوصول إلى تشخيص صحيح للكائن المسبب لتجرثم الدم وهي كما يلي .:

عند مشاهدة النمو في مزرعة الدم بالعين المجردة يتم إجراء ما يلي .:

1 - أخذ قطرة من مزرعة الدم وعمل مسحة smear وصبغها بصبغة غرام Gram stain لمعرفة شكل وترتيب الكائن الموجود في العينة وتفاعله مع الصبغة ثم

إخبار الطبيب بالنتيجة مبدئياً.

2- نقل عينة أخرى من مزرعة الدم Blood culture بطريقة معقمة وزراعتها (sub culture) على عدة أوساط اعتماداً على نتيجة الصبغة ومن الأوساط المستخدمة هنا وسط Chocolate agar ووسط Blood agar ويمكن استخدام وسط MacConkey agar عند مشاهدة البكتيريا السالبة لصبغة غرام في المسحة المصبوغة ثم يفضل حضن وسط Blood agar لا هوائياً وحضن وسط Chocolate agar هوائياً بوجود نسبة من CO₂.

3- إجراء فحص التحسس للمضادات الحيوية Susceptibility test على عينة من مزرعة الدم مباشرة بطريقة قرص الانتشار Disk diffusion.

4- قراءة نتائج الزراعة وفحص التحسس بعد فترة الحضانة وتزويد الطبيب بالنتيجة مباشرة.

ب- أما عند عدم مشاهدة النمو في المزرعة بالعين المجردة وظهور النمو في المزرعة العشوائية Blind sub culture فيجب إعداد مسحة مصبوغة بصبغة غرام وعمل فحص الحساسية للمضادات الحيوية والفحوصات التشخيصية الأخرى للمستعمرات النامية في المزرعة العشوائية Bind sub culture ثم تزويد الطبيب بالنتيجة مباشرة.

تقييم النتيجة الإيجابية لمزرعة الدم :

إن أكبر المشاكل التي تواجه زراعة الدم هي مشكلة التلوث حيث أن 30% من مزارع الدم الإيجابية تُظهر تلوثاً بالساكن الطبيعي الموجود على جلد الإنسان وذلك بسبب التساهل في عملية تعقيم الجلد قبل سحب العينة. وتحتوي معظم مزارع الدم الإيجابية على كائن واحد مسبب لتجرثم الدم بينما يظهر في حوالي 2-30% من مزارع الدم الإيجابية عدة أنواع من البكتيريا مجتمعة أو الفطريات كمسبب لتجرثم الدم. وتساعد النقاط التالية على تحديد صحة ودقة زراعة الدم الإيجابية وتميز النتيجة الإيجابية الصحيحة True positive عن التلوث الجرثومي للعينة السليمة Contamination :

أ- نمو نفس الجرثومة في عدة مزارع أخذت في أوقات مختلفة ومن عدة مناطق من الجسم دليل على وجود تجرثم الدم .

ب- نمو نوع واحد في أحد المزارع وعدم نموه في غيرها دليل على التلوث ويفضل إعادة الزراعة مرة أخرى مع مراعاة ظروف التعقيم بشكل جيد .

ج - نمو أنواع جرثومية مختلفة في مزارع دم متعددة دليل على التلوث Contamination إذ يفضل إعادة الزراعة مرة أخرى .

د- نمو الساكن الطبيعي للجلد Skin Normal Flora مثل diphtheroids anaerobic gram positive cocci ، Staphylococcus epidermidis

في مزرعة دم واحدة دليل على التلوث بينما نمو النفس الأنواع السابقة في عدة مزارع لنفس الشخص دليل على وجود تجرثم الدم .

ملاحظة : يكتب تقرير المختبر اعتماداً على النتائج التي يتم الحصول عليها خلال فترة الحضانة أو بعدها وهي في العادة تكون كما يلي :

1 - عند مشاهدة مظاهر النمو البكتيري في المزرعة يتم تأكيد ذلك بإجراء صبغة غرام وعندما تكون نتائج الصبغة إيجابية يتم أخبار الطبيب المعالج بالهاتف مبدياً بظهور النمو وبعد ذلك يكتب تقرير زراعة الدم النهائي Final blood culture report الذي يكون محتوياً على أسم الكائن المسبب لتجرثم الدم ونتيجة فحص التحسس للمضادات الحيوية Susceptibility test .

2- يتم كتابة تقرير مبني خلال 1-7 أيام من الحضانة وخاصة عند عدم ظهور النمو ويصاغ كما يلي مثلاً:

(Blood culture show no growth after 3 day final report to follow)

*3 أما التقرير النهائي عند عدم ظهور النمو في المزرعة يكون بعد سبعة أيام من الحضانة في العادة كما يلي :

(Final report : Negative after 7 days incubation)

باستثناء بعض المسببات التي تحتاج إلى فترات حضانة أطول من أسبوع بسبب نموها البطيء كما أسلفنا .

الأنظمة الآلية لمزارع الدم Automated blood culture systems :

يعتبر حاليا ظهور العديد من الأنظمة الآلية Automated للكشف عن ظهور النمو في مزارع الدم إذ تتم عملية الحضانة ومتابعة النمو وأعطاء النتيجة آليا وتتميز الطرق الآلية بشكل عام عن الطرق اليدوية بما يلي :

1- توفير الوقت إذ يتم الحصول على نتيجة الزراعة الإيجابية بوقت أقل وسرعة أكثر من الطرق اليدوية

2- أكثر دقة وحساسية من الطرق اليدوية : ويقوم النظام الآلي ذاتيا بالكشف عن النمو البكتيري في مزارع الدم من خلال قياس نسبة ثاني أكسيد الكربون الناتجة من تحلل الكربوهيدرات في المزرعة كأحد نواتج الأيض ويعتبر النوعين التاليين هما الأكثر شيوعا في أجهزة الكشف الآلي عن النمو في مزارع الدم :

1-نظام Bactec،

وهو نظام يعتمد على اخذ كمية من الهواء الموجود في مزرعة الدم ثم قياس نسبة CO₂ وهي في العادة كما يلي :

الطريقة الاولى : تعتمد على قياس نسبة CO₂ في المزرعة بالطريقة الإشعاعية Radio metric إذ تستخدم مركبات تحتوي على كربون مشع مثل ¹⁴C-glucose تعمل البكتيريا على تحليلها وإنتاج مركب CO₂ المحتوي على ذرة الكربون المشعة فتستخدم الطريقة الإشعاعية لقياس نسبة الكربون المشع وبالتالي يتم قياس نسبة ثاني أكسيد الكربون الموجود في العينة

الطريقة الثانية : فتعتمد على القياس الكمي لغاز CO₂ في المزرعة بواسطة جهاز الطيف الضوئي المزود بالأشعة تحت الحمراء Infrared spectrophotometer .

2- نظام Bac-T/Alert ،

الذي يعتمد على قياس تغير لون المزرعة والنتاج عن زيادة نسبة غاز ثاني

أوأكسيد الكربون فيها الذي يعمل على تغيير درجة PH الوسط من قاعدي إلى حامضي وبالتالي ولوجود كاشف Indicator خاص مضاف إلى مكونات المزرعة فإن تغيراً في اللون سوف يظهر فيتم قياس اللون الناتج من النمو بواسطة جهاز الطيف الضوئي العادي spectrophotometer .واعطاء نتيجة إيجابية دالة على وجود النمو آلياً .

ملاحظة : تحتاج بعض الأحياء الدقيقة المسببة لتجرثم الدم تقنيات خاصة من أجل عزلها من الدم إذ يمكن أن تعطي مزارع الدم نتيجة سلبية مع وجود الجراثيم فيها والأحياء التالية تحتاج إلى تقنيات خاصة لعزلها من الدم .:

١ - Brucella البروسيلا ،

تحتاج أنواع هذه البكتيريا لفترة حضانة طويلة بسبب غوها البطيء بحيث تتراوح فترة الحضانة اللازمة من 4-6 أسابيع قبل إعطاء النتيجة السلبية للزراعة . ويتم مراقبة دلائل النمو وعمل زراعات sub cultures كل عدة أيام لمتابعة ظهور النمو أو عدمه وتعطى النتيجة السلبية بعد انقضاء الستة أسابيع من الحضانة .

ب- Leptospira ،

إن هذه البكتيريا من اللولبيات المتحركة إذ تسبب مرض Leptospirosis للإنسان وتظهر هذه البكتيريا في الإنسان خلال الأسبوع الأول من المرض لذا يتم الكشف عنها فقط خلال الأسبوع الأول من الإصابة إذ تزرع على أوساط خاصة مكونة من الالبومين والأحماض الدهنية حيث حضن 1-3 قطرات من الدم الكامل المخلوط مع مادة SPS في وسط Leptospira media وحضنه في الهواء لمدة 4-6 أسابيع على درجة حرارة 28 درجة مئوية ثم يتم بعد ذلك فحص النمو على الوسط بواسطة تقنية الحقل المظلم Dark field techniques- .

ج-أنواع Mycobacterium ،

تعد بعض أنواع هذه البكتيريا وخاصة النوعين M.avium و M.intracellulare أحد أهم الأسباب التي تسبب تسمم الدم لدي المصابين بالايبرز.

وتستخدم تقنية الطرد المركزي التحليلي Centrifugation- Lysis لاعداد الدم للزراعة ثم يؤخذ الراسب ويحضان في أوعية خاصة بنظام Bactec التي تحتوي على وسط خاص لتنمية هذه البكتيريا وهو Middle brook media ويحضان الوسط مع نسبة من CO2 من 5-10 أيام ثم عمل زراعات sub culture ومسحات مصبوعة بصبغة Acid - fast stain بين فترة وأخرى من الحضانة .
الطرق غير الزراعية المستخدمة في تشخيص حالة تجرثم الدم :

تستخدم عدة طرق غير الزراعة من اجل تشخيص الكائن المسبب لتجرثم الدم وذلك من خلال ما يلي .:

أ- الكشف عن انتجين Antigen البكتيريا أو الاجسام المضادة التي كونها الجسم نتيجة لتجرثم الدم بواسطة الطرق المصلية مثل طريقة التخرثر Latex agglutination وطريقة ELISA وغيرها .

ب- استخدام تقنية PCR للكشف عن العديد من الجراثيم في الدم .

ج- استخدام طريقة الكروماتوغرافي Chromatography للكشف عن وجود نواتج الأيض الخاصة بنمو الجراثيم مثل الأحماض الدهنية والسموم .

الباب الثامن

مسحات العين Eye swabs

(Eye culture)

مقدمة :

تعد العين من الأعضاء المهمة في جسم الإنسان إذ أن أجزاءها الداخلية والخلفية تكون محمية ومعقمة بشكل طبيعي بينما تكون الأجزاء الأمامية وخاصة السطحية منها عرضة للهواء والعوامل الميكانيكية الأخرى .لذا يساعد الدمع Tear على حماية وغسل مقدمة العين (الملتحمة Conjunctiva) بسبب احتوائه على مواد قاتلة للجراثيم مثل أنزيم Lysozyme الذي يعمل على تحطيم الجدار الخلوي للبكتيريا ويقوم الجفن والدمع معاً بعملية تعقيم وغسل وتنظيف مستمرة لمقدمة العين مع ذلك فإن سطح الملتحمة قد يحتوي على أنواع قليلة من الساكن الطبيعي غير الممرض والتي تكون قد تأقلمت مع المواد القاتلة للجراثيم الموجودة في الدمع ومن أمثلتها :

Diphtheroids (coryne bacterium Xerosis)

S. epidermidis

Non-hemolytic streptococci

Micrococci

التهابات العيون Eye infections .:

تعرض العين للإصابة ببعض الالتهابات نتيجة أنواع قليلة من الجراثيم التي تقاوم تأثير الدمع المضاد للجراثيم وتأتي التهابات العيون من مصدرين رئيسيين هما :

أ - المصدر الخارجي: إذ قد تسبب البكتيريا الموجودة على الجلد كساكن طبيعي أو القلادة مع الهواء التهابات للعين وخاصة في حال تعرض العين للجروح أو الخدوش أو الكدمات أو التحسس أو تدني المناعة بشكل عام .

ب- مصدر داخلي: ينتقل عدد من أنواع الجراثيم عبر الدم أو اللمف وخاصة إلى الأجزاء الخلفية من العين ليكون سبباً في حدوث التهاباتها في بعض الأحيان وتكون أجزاء العين كافة عرضة لحدوث الالتهاب إذ يمكن تقسيم التهابات العين إلى جزئين رئيسيين هما ::

أولاً :: الالتهابات الخارجية وهي

أ- التهاب الملتحمة Conjunctivitis

وهو يظهر في العادة تظهر بشكل متقيح Purulent إذ يكون مخاطياً في الالتهاب البكتيري ويكون مائياً في النوع الفيروسي أما النوع الناتج من الكلاميديا فيبدأ على شكل تحوصل وتجبب في الملتحمة . وقد يصاب الأطفال حديثي الولادة بالتهابات ملتحمة العين والناتج من التهاب مجرى الولادة بالعديد من الجراثيم .

ب- التهاب جفن العين Blepharitis

والناتج عادة من أنواع عدة من البكتيريا وخاصة الموجودة كساكن طبيعي على الجلد.

ج- التهاب القرنية Keratitis

تحدث التهابات القرنية في العادة نتيجة لتعرض العين للكدمات أو الجروح في الملتحمة والتي تعتبر من اخطر التهابات العين إذ أنها قد تسبب العمى في فترة زمنية وجيزة وتعتبر البكتيريا هي اكثر أنواع الأحياء الدقيقة شيوعاً في إحداث هذه الالتهابات .

ثانياً الالتهابات الداخلية .

التي تشمل العين الداخلية Endophthalmitis والناتجة إما من دخول الجراثيم عبر الدم أو اللمف أو مرورها عبر جروح الملتحمة وكدماتها وخاصة بعد العمليات

الجراحية وفي العادة تكون البكتيريا الموجودة كساكن طبيعي في العين والجلد هي المسببات الأكثر شيوعاً لالتهابات مآبعد العمليات الجراحية وخاصة بكتيريا S.aureus وتعتبر الأحياء الدقيقة التالية هي المسببات الأكثر شيوعاً لالتهابات العيون .

1- البكتيريا :

الأطفال (اقل من سنة)	الأطفال والبالغين
S.aureus	Haemophilus spp
Coag.Negative staph	S.pneumonia
Enterobacteriaceae	S.aureus
Pseudomonas	Haemolytic streptococci
Neisseria	Neisseria
Chlamydia trachomatis	Moraxella
	Enterobacteriaceae
	Pseudomonase
	Chlamydia trachomatis
	Corynebacterium spp
	Coag. Negative staphylococci
	Acinetobacter

2- الفطريات Fungi مثل Candida و Actinomyces

3- الطفيليات Parasite مثل بعض الديدان و Toxoplasma

4- الفيروسات Viruses

جمع العينات Specimens Collection :

تعتمد طريقة جمع عينة التهابات العين على مكان وجود الالتهاب فيها إذ إن كل موقع التهاب معين له طريقة مختلفة في الحصول على العينة وتقسم طرق اخذ عينات التهابات العيون إلى ما يلي :

أ- المسحات Swabs

يعتبر اخذ مسحة swab من إفرازات العين Eye Discharge هي الطريقة الأكثر شيوعاً لجمع عينات التهابات ملتحة وجفن العين وخاصة عند وجود كمية كبيرة من الإفرازات إذ تستخدم ماسحة قطنية Cotton swab نظيفة ومعقمة لجمع الإفرازات أما في حالات وجود Chlamydia فتستخدم ماسحة نظيفة جافة مضافاً إليها مادة Calcium alginate حيث يتم اخذ المسحة بالطريقة التالية .:

- 1- سحب جفن العين السفلي إلى الأسفل .
- 2- إدخال الماسحة القطنية ثم اخذ العينة من اسفل كيس الملتحمة أو من التقرحات إن وجدت
- 3- في حال وجود كمية كبيرة من القيح Pus يتم إزالته بماسحة معقمة ثم رميها وتؤخذ العينة بماسحة أخرى جديدة .
- 4- يفضل التعامل مع العينة مباشرة أو وضعها في وسط حفظ ونقل مناسب لحين زراعتها .

ب- الكشط Scraping

يتم اللجوء إلى عملية الكشط scrapin في حالة عدم وجود كمية كبيرة من إفرازات العين إذ تستخدم هنا ملعقة من البلاتين Paltinum sptula لإجراء عملية انكشط من الملتحمة ومن جفن العين ويفضل أن يقوم بعملية الكشط الطبيب المختص.

ج- السحب المباشر Aspiration

يقوم الطبيب المختص بعملية السحب Aspiration والتي تستخدم لتشخيص التهابات العين الداخلية أو الدامل Abscess المغلقة عادة .
نقل وحفظ العينات .:

يفضل التعامل المباشر مع العينات المخوفة من العين وذلك نتيجة لتعرضها للتلف بسبب وجود أنزيم Lysozyme في العينة الذي يؤدي إلى قتل بعض أنواع

البكتيريا كذلك فهي معرضة أيضاً للجفاف السريع لكون عينات العيون في العادة قليلة الحجم. ويمكن أن تبقى الماسحة Swab صالحة للزراعة لمدة ساعتين على درجة حرارة الغرفة ويمكن وتحفظ ان لزم الأمر في الثلاجة بدرجة حرارة 2-8 درجات مئوية أو تنقل في صندوق تبريد Cooling box لفترة زمنية لا تتجاوز 24 ساعة أما عند الحاجة إلى نقل مسحة العين إلى مختبر قريب فيمكن نقل الماسحة swab في أنبوب اختبار معقم يحتوي على نصف مليلتر من المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline كذلك يجب مراعاة الظروف اللاهوائية أثناء نقل كافة عينات العين ماعدا العينات المخوفة من المتلحمة .

ملاحظات ،

- 1- يفضل تحديد مكان اخذ العينة من العين بحيث يذكر ذلك في النموذج المرفق مع العينة مثل Conjunctiva sample أو Corneal sample ولا يجب استخدام مصطلح عينة من العين Eye sample فقط .
 - 2- يجب تحديد من أي عين أخذت العينة هل هي من العين اليسرى Left eye أو من اليمنى Right eye .
 - 3- يفضل التنسيق بين الطبيب وفني المختبر قبل اخذ العينة من اجل إعداد وتحضير الأوساط المناسبة للزراعة اعتماداً على نوع الالتهاب ومكانه .
 - 4- يفضل اخذ عينتين من مكان الإصابة بواسطة ماسحتين منفصلتين إحداهما تستخدم للزراعة والثانية للفحوصات الأخرى مثل المسحات المصبوغة .
 - 5- يجب اخذ العينة قبل تناول المضادات الحيوية .
 - 6- يتم تعقيم الجفن بطريقة مشابهة لتعقيم الجلد قبل اخذ العينة منه .
- الزراعة والتشخيص Culture and Identification .**

يتم التعرف على الكائن المسبب لالتهابات العيون بواسطة عدة خطوات متتالية وهي كما يلي :

1- التحضير الرطب Wet mount

يتم اجراء التحضير الرطب بإضافة 10% KOH على العينة المخوفة من العين للتعرف علي بعض الفطريات مثل Candida و Actinomyces .

2- الصبغ Staining

تستخدم عملية الصبغ للتعرف على العديد من مسببات التهابات العيون وتكون العينات المخوفة بواسطة الكشط أفضل لاجراء عملية الصبغ من تلك المخوفة بالماسحة swab ويعتبر الصبغ بصبغة غرام G.stan مفيداً للتعرف على معظم أنواع البكتيريا المسببة لالتهابات العيون ما عدا بعض الأنواع مثل الكلاميديا C.trachomatis التي تسبب مرض التراخوما Trachoma حيث يتم التعامل مع العينات المتوقعة وجود الكلاميديا فيها بالطريقتين التاليتين .:

أ- الصبغ باليود Iodine أو بصبغة جيما Giemsa إذ يتم معاملة العينة المخوفة من الملتحمة بواسطة الكشط بإحدى الصبغتين السابقتين للاستدلال على وجود الكلاميديا ويكون ذلك بمشاهدة أجسام قاعدية Basophilic inclusion Bodies داخل سيتوبلازم الخلايا المخوفة بعملية بواسطة المجهر الضوئي

ب- الصبغات التألقية المناعية المباشرة Direct Immunofluorescent staining :

تعطي هذه التقنية نتائج دقيقة وسريعة لتشخيص وجود الكلاميديا وذلك لأنها تجري على العينة مباشرة .

الزراعة Culturing

1- أ) تزرع العينات المخوفة من العيون عادة على وسطي agar Blood و Chocolate agar إذ يعتبر الأخير هو الأفضل لتنمية معظم مسببات التهابات العيون ويفضل زراعة العينة أيضاً في الوسط السائل Thioglycolate broth.

2) يحضن وسط Blood agar في Candile Jar تحت الظروف اللاهوائية وخاصة في إصابات العين الداخلية كما ويفضل حضانة الوسطين في ظروف

هوائية بوجود (5-10%) CO₂ من اجل المساعدة في تشخيص وتنمية
الأنواع اللاهوائية .

3) يتم مراقبة ظهور النمو بعد 48 ساعة من الحضانة .

ب- يتم زراعة عينة العين للكشف عن الفطريات Fungi على وسط SDA أو
وسط Brain- heart infusion إذ تؤخذ العينة بعملية الكشط بواسطة
الملقعة المعدنية Spatula ثم تزرع على أحد الوسطين السابقين بعمل قطع
في الآجار Agar على شكل حرف C (C-shape cut) و ثم تشخص
بواسطة التحضير الرطب .

ج- يفضل اخذ عينة للزراعة من كلا النوعين وخاصة في التهاب الملتحمة
لتمييز الساكن الطبيعي عن الكائن المسبب للالتهاب .

د- يجب عمل فحص التحسس البكتيريا للمضادات الحيوية Susceptibility
test لأي نمو يظهر على الأوساط الزراعية ويفضل اختيار مضادات حيوية
تكون على شكل قطرة أو دهن Cream للعين .

التشخيص وتقييم نتائج الزراعة .

أ - تعتبر الأنواع البكتيرية الثلاثة التالية:

Staphylococcus و N.gonorrhea و Chlamydia أكثر الأنواع شيوعاً في
التهابات العيون لدى الأطفال حديثي الولادة New born حيث يظهر الالتهاب
الناتج من N.gonorrhea في اليوم الثالث إلى الخامس بعد الولادة ويظهر التهاب
الكلاميديا ما بين اليوم الخامس والرابع عشر بعد الولادة بينما يظهر الالتهاب
الناتج من staph في أي وقت من الحية علماً إن النوعين الأولين يسببان التهاب
الملتحمة لدى الكبار أيضاً . حيث يمكن تشخيص الكلاميديا في العينة مباشرة
بواسطة صبغة Giemsa أو بالصبغات التألقيّة المناعية كما بينا سابقاً بينما يتم
تمييز بكتيريا Neisseria بعد نموها على وسط chocolate agar بواسطة صبغة
غرام أو بواسطة فحص Oxidase .

ب- تسبب بكتيريا *Moraxella Lacunata* التهاب سائل التجويف الأمامي وملتحمة العين وتكون عبارة عن بكتيريا سمكية وقصيرة عصوية مزدوجة *Diplobacilli* سالبة لصبغة غرام وفضل وسط لزاعتها هو *Loefflers media* حيث تؤدي إلى عمل حفرة في الوسط بسبب قدرتها على تحليل الجلوتين.

ج- *Haemophilus aegyptius* وهي عبارة عن بكتيريا عصوية صغيرة سالبة لصبغة غرام مشابهة تماماً في صفاتها لبكتيريا *H.influnzae* تنمو بشكل جيد على وسط *Blood agar* وتسبب التهاب الملتحمة البائي والذي يسمى *Pink eye*.

د- تسبب بكتيريا *C.diphtheria* مرض التهاب الملتحمة ذا الغشاء الكاذب *Pseudo membranous Conjunctivitis* التي يفضل زراعتها على وسط *Loefflers media* و *Pai media* وتشخص أيضاً من خلال إنتاجها للسموم بواسطة فحص *Elek test*.

هـ- تنتج التهابات العين الداخلية عادة بعد العمليات الجراحية وخاصة بعد عملية إزالة الماء الأزرق *Cataract* عادة. وتعتبر *S.aureas* هي المسبب الشائع لالتهابات العين الداخلية كما وقد تعمل *S.epidermedia* على إحداث هذا الالتهاب أيضاً.

الباب التاسع

مسحات الأذن Ear swabs

(Ear infection)

مقدمة :

تتعرض الأذن كغيرها من أعضاء الجسم لحدوث التهابات متعددة تسببها البكتيريا والفطريات وتنتج التهابات الأذن بشكل عام من مصدرين رئيسيين هما :
أ- مصدر خارجي عبر صيوان الأذن وقناة السمع وهذا غالباً يكون مصدراً لالتهاب الأذن الخارجية Otitis Externa .

ب- مصدر داخلي وهو قدوم المسبب من التجويف الفمي والانفي عبر قناة استاكيوس إذ تؤدي التهابات التجويف الانفي والفمي غالباً الى حدوث التهابات الأذن الوسطى Otitis media وقد ينتقل الالتهاب عبر افرازات الأذن الوسطى مسبباً التهاب الأذن الخارجية .

وتعتبر الانواع التالية المسببات الأكثر شيوعاً لالتهابات الأذن الخارجية
External ear infection .

S.aureus

S.pyogenes

Pseudomonas aeruginosa

Vibrio spp

Aspergillus (Fumigatus ,Niger)

Candida spp

اما المسببات الشائعة لالتهبات الأذن الوسطى (Middle ear Otitis media)

فهي .

S.pneumonia

S.pyogenes

H.influenzae

S.aureus

Hemolytic streptococci

Moraxella Catarrhalis

P.aeruginosa

E.coli

Proteus

وانواع اخرى من Candida , Aspergillus , Coliforms Bacteria
اما اهم الانواع التى تسبب التهاب الاذن الوسطى المزمن Chroic فهي.

Bacteroides

Fungi

Anaerobic bacteria

enteric bacilli

وتعد الانواع التالية كمسببات انتهازية وغير شائعة لالتهابات الاذن بشكل

عام .:

Fusobacterium

Coag.Negative staph

Micrococc

Diphtheroids

Bacillus spp

C.diphtheriae

Mycobacterium spp

Mycoplasma pneumoniae

Saprophytic Fungi

Actinomyces

وفي بعض الحالات يؤدي تناول كمية كبيرة من المضادات الحيوية لمعالجة
التهاب الاذن الوسطى المزمن Chronic الى حدوث العظمة الموجودة خلف الاذن
(الخشاء) Mastoiditis ويسبب هذا الالتهاب في العادة أنواعاً متعددة من البكتيريا
اللاهوائية anaerobic bacteria .

جمع العينات Specimen Collection :

1- الاذن الخارجية External ear :

تعتبر التهابات الاذن الخارجية مشابهة لالتهابات الجلد اذ يفضل تعقيم الاذن
الخارجية بشكل جيد بمحلول Benzyl konium chloride بتركيز 1000/1 او بكحول

70% وباليود 2% للتخلص من الساكن الطبيعي الموجود على الجلد ومنع تلوث العينة بها ثم بواسطة ماسحة قطنية معقمة steril cotton swab يتم اخذ المسحة بعملية التدوير الشديد من التقرح او الإفرازات ان وجدت .

2- الاذن الوسطى Middle ear ،

ويفضل ان يقوم الطبيب المختص او الجراح بأخذ الافرازات الناتجة من الالتهاب بواسطة عملية السحب (البزل) Aspiration إلا أنه يتم اللجوء في بعض الحالات الى أخذ مسحة من الافرازات التي تكون في قناة السمع ويفضل في هذه الحالة تعقيم قناة السمع وازالة الفرازات بماسحة واخذ العينة بماسحة swab صغيرة اخرى لتقليل التلوث الجرثومي للعينة والناتج من البكتيريا الموجودة أصلاً كساكن طبيعي في القناة السمعية .

نقل العينات Specimens Transport،

تبقى مسحات وعينات الاذن صالحة للزراعة لمدة لاتزيد عن ساعتين على درجة حرارة الغرفة ويمكن حفظها في الثلاجة لمدة لاتزيد عن 24 ساعة . وتستخدم عدة اوساط حفظ ونقل مثل وسط amies transport media الذي يحفظ العينة لمدة لا تزيد عن 24 ساعة ويجب توفير ظروف لا هوائية في عملية النقل وخاصة للعينات المسحوبة من الاذن الوسطى (Aspiration) .

الزراعة والتشخيص Culture and Idintification ،

تقسم الفحوصات التي تجرى على العينة المأخوذة من الاذن الى قسمين .:

1 - الفحص المباشر ويتضمن ما يلي :

أ - التحضير الرطب Wet mount:

ويستخدم للكشف عن الفطريات عادة بانواعها المسببة للالتهابات الاذن بشكل عام بعد خلط العينة مع 10% KOH لمشاهدة الابواغ او الخيوط الفطرية

ب - اجراء صبغة غرام Gram stain لمسحة smear من العينة مباشرة من اجل التعرف على بعض صفات البكتيريا المسببة للإلتهاب .

ج- الفحوصات المصلية مثل فحص التخثر Latex agglutination والمستخدم عادة للكشف عن انتجينات S.pneumonia في العينة مباشرة كما يستخدم الفحوصات التآلفية المناعية (Radioimmuno assay RIA) للكشف أيضاً عن انتجينات العديد من البكتيريا مثل H.influnzae

الزراعة Culturing :

أ - تزرع المسحات المأخوذة من الاذن في العادة على وسطي Blood agar و MacConkey agar وتحضن الاوساط في ظروف هوائية على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 24 ساعة وفي حال ظهور النمو يتم دراسته من الناحية الشكلية والصفات الكيميائية الحيوية و المصلية ثم يتم اجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية .

ب- من اجل عزل H.influnzae عند الاطفال خاصة يتم زراعة العينة على وسط Chocolate agar ويحضن في جو يحتوي على نسبة 5-10 CO2 % ثم يتم متابعة ظهور النمو لمدة 48 ساعة .

ج - اما في حالة الإصابة المزمنة او التهاب عظمة خلف الاذن يتم حقن العينة في وسط Blood agar مع اضافة بعض المضادات الحيوية مثل Kanamycin للتخلص من البكتيريا الملوثة للعينة ثم يحضن الوسط لمدة 48 ساعة في ظروف لا هوائية.

د - من اجل عزل الفطريات تحقن العينة في وسط SDA وتحضن على درجة حرارة الغرفة ثم يراقب ظهور النمو لمدة ستة ايام .

الباب العاشر

مسحات الجروح والحروق

Wounds and Burns Swabs

مقدمة :

يلعب الجلد دوراً مهماً في حماية الجسم من المؤثرات الخارجية وهو يعتبر خط الدفاع الأول وجزءاً مهماً من جهاز المناعة العام في الجسم إذ تكمن قدرته في حماية الجسم على وجود طبقة الكيراتين Keratin المغلفة لطبقة البشرة المكونة بدورها من خلايا عديدة مترابطة والتي تعمل مجتمعة على حماية الأنسجة المهمة و التالية للبشرة من تأثير العديد من العوامل الفيزيائية و الكيميائية و الجرثومية وتعتبر الجروح الميقة Deep wounds أو السطحية Surface Burns و الحروق بأنواعها من أهم الأمثلة على العوامل التي تسبب تلف هذا الخط الدفاعي المهم للجسم .

ويحتوي سطح الجند في الوضع الطبيعي على عدد كبير من الجراثيم الموجودة كساكن طبيعي Normal Flora والتي تكون أحد أهم مصادر التهابات الجروح والحروق، وان تعرض الجلد للكدمات أو التشقق أو العمليات الجراحية أو الحروق يتيح المجال لحدوث الالتهابات بأنواعها والتي تنتج في العادة من عدة أنواع مجتمعة من الجراثيم الهوائية aerobice و اللاهوائية anaerobice أو الاختيارية Facultative حيث تفضل الأنواع اللاهوائية عادة الجروح العميقة .

وتعتبر الأنواع الجرثومية التالية المسببات الأكثر تكراراً في التهابات الجروح و الحروق المفتوحة Open Wounds and Burns :

Staph .aureus	Hemolytic Streptococci
Staph . epidermidis	Bacteroidis
Micrococcus	Clostridium spp
Stre.Pyogenes	Pseudomonas spp
E.Coli	Dermatophytes Fungi
Diphtheroids	Anaerobic Streptococcus
Proteus	Fusobacterium
Enterococci	Klebsiella

أما الأنواع التالية فهي من المسببات قليلة الوجود في التهابات الجروح والحروق بشكل عام :

Mycoplasma .spp	Blastomyces
Haemophilus spp	Actinomyces
Mycobacterium spp	Candida
Bacillus	Nocardia
C.diphtheriae	Neisseria
Yersinia	Brucella
	Salmonella
	Aspargillus
	Cryptococcus

جمع ونقل العينات Specimens Collection and Transport

يتم جمع عينات التهابات الجروح والحروق بعلّة طرق اعتماداً على حالة الالتهاب وطبيعته وأهم طرق جمع هذه العينات هي :

wound cultures

surface wounds



طريقة جمع ونقل عينات الجروح والحروق

1- المسحات Swabs .:

تعتبر المسحات هي الطريقة الشائعة لجمع عينات الجروح والحروق ومن اجل جمع عينة مناسبة وسليمة يفضل اتباع ما يلي .:

أ- تعقيم مكان أخذ العينة بشكل جيد وذلك لتلافي تلوث المسحة بالبكتيريا الموجودة كساكن طبيعي على الجلد .

ب- بواسطة ماسحة قطنية cotton swab معقمة يتم أخذ العينة من عمق مكان الالتهاب وليس من سطحه .

ج- في حالة الالتهابات المغلقة يتم فتح الالتهاب بواسطة إبرة Needle أو واخزة Lancet ثم اخذ المسحة بشكل جيد وبظروف معقمة .

2- السحب (البزل) Aspiration .:

تستخدم هذه الطريقة في حالة الالتهابات المتقيحة والعميقة إذ يجب تعقيم الجلد بشكل جيد ثم أخذ القيح Pus بواسطة إبرة معقمة .

ويمكن استخدام عملية الكشط Scraping في حالة الالتهابات التي لا تحتوي على قيح Pus وتظهر هذه الحالة عادة في الالتهابات الفطرية السطحية . Dermatophytes

النقل Transport :

يفضل نقل المسحة بسرعة إلى المختبر ويمكن أن تحفظ في الثلاجة على درجة حرارة 2-8 درجات مئوية لفترة لا تزيد عن ساعة واحدة . أما عينات الكشط Scraping التي تستخدم للكشف عن الفطريات فتحفظ وتنقل على درجة حرارة الغرفة فقط . ويفضل أن تنقل المسحات بظروف هوائية أما العينات المأخوذة بواسطة عملية السحب Aspiration فيجب نقلها لا هوائياً باستخدام حقبة خاصة بذلك anaerobic bag أو بواسطة السرنج Syringe على أن يبقى مغلقاً بشكل جيد .

ويمكن استخدام أوساط نقل مثل وسط Cary-Blair media أو وسط Amies مع توفير الظروف اللاهوائية عند نقل العينات المأخوذة بواسطة السحب (البزل) Aspiration .

فحص العينات Specimens Examination .:

تمر عملية فحص العينات بالخطوات التالية .:

1- الفحص الظاهري Macroscopic Exam .:

يمكن أن يعطي لون أو رائحة أو قوام عينة القيح Pus دلائل قد توجه عملية التشخيص فمثلاً تعطي الجراثيم اللاهوائية في العادة لوناً بنياً للقيح وقد يدل القيح الأزرق على وجود بكتيريا *P.aeruginosa* أما الرائحة الكريهة للقيح فهي دلالة على أن سبب الالتهاب هو بكتيريا لا هوائية مثل بكتيريا *C.perfringens* .

الفحص المجهرى Microscopic Exam .:

أ - التحضير الرطب Wet mount .

يفيد التحضير الرطب لعينات الجروح والحروق عندما تكون الفطريات هي مسبب الالتهاب إذ يمكن مشاهدة الأبواغ أو الخيوط الفطرية تحت المجهر .

ب- صبغة غرام Gram stain .

يفضل عمل مسحة smear من العينة وصبغها بصبغة غرام وهذا يساعد في اختيار أوساط الزراعة اعتماداً على نوع الجرثومة التي قد تظهر في المسحة smear وقد أشارت بعض الدراسات الى أن احتواء المسحة المصبوغة على كمية من الخلايا الطلائية الحرشفية المغطية للجلد قد يكون دليلاً على تلوث العينة ويمكن عمل مسحة smear وصبغة مباشرة بصبغات تألقية مثل صبغة auramine stain للتعرف على الكائن المسبب للالتهاب .

3- الزراعة Culturing .:

يفضل زراعة عينات الجروح والحروق بشكل روتيني على الأوساط التالية .:

- وسطين من Blood agar .

- Neomycin blood agar .

- MacConkey agar .

- Cooked meat media -

- Thioglycolate broth -

أ - يحضن وسط Blood agar و MacC. هوائياً مع وجود 5-10 % CO₂ على درجة حرارة 37 درجة مئوية .

ب - ويحضن وسط Blood agar الثاني ووسط Neomycin B.A. لا هوائياً على درجة 37 درجة مئوية ويراقب ظهور النمو خلال 2-3 أيام .

ج - يحضن وسط Cooked meat media لمدة 4-5 أيام على درجة 37 درجة مئوية ثم يراقب ظهور النمو على سطح الوسط إذ أن هذا الوسط يعتبر وسطاً غنياً يساعد في نمو الأنواع الهوائية واللاهوائية من البكتيريا .

د - ويمكن استخدام أوساط زراعية أخرى مثل Chocolate agar عند الشك بوجود H.influenzae أو وسط SDA لتنمية الفطريات .

هـ - يفضل زراعة المسحة swab بشكل عام تحت الظروف الهوائية أما العينات المأخوذة بالسحب Aspiration أو المأخوذة من التقرحات المغلقة أو الجروح العميقة فيفضل نقلها وزراعتها تحت الظروف اللاهوائية .
وبشكل عام يجب عدم زراعة العينات التالية لا هوائياً :

1 - المسحات المأخوذة من اللوزتين ، الأنف ، الأليل ، الرحم ، المهبل ، المستقيم ، الملتحمة ، الأذن الخارجية ، الجلد ، الجروح والحروق السطحية .

2 - العينات مثل البلغم ، البول ، البراز ، ومحتويات الأمعاء .

الباب الحادي العاشر

سوائل الجسم Body Fluids

مقدمة :

يحتوي جسم الإنسان على أنواع متعددة من السوائل غير الدم والسائل النخاعي الشوكي وأهم السوائل الجسمية هي :

1- سوائل المفاصل Synovial or Joint fluids

2- السائل البلوري المحيط بالرئة Pleural fluid

3- السائل المحيط بالقلب Pericardial fluid

4- سائل البطن Peritoneal fluid

التي تعتبر جميعها سوائل معقمة لوجودها بكميات قليلة في تجاويف جسمية مغلقة إلا أن وجود أي بكتيريا فيها هو دليل على وجود الالتهاب وقد تشكل هذه البكتيريا خطراً على حياة الشخص المصاب كما أن زيادة كمية السائل في تجويفه الخاص يؤدي إلى أعراض ودلائل معينة تشير إلى بعض الحالات المرضية أو إلى الالتهابات .

وتظهر السوائل الجسمية الملتهبة عادة بشكل متقيح Purulent لوجود كميات كبيرة من كريات الدم البيضاء Pus cells فيها وتعتبر الأنواع البكتيرية التالية من أهم مسببات التهابات سوائل الجسم .

1- سوائل المفاصل ،

S.aureus

S.pyogenes

Streptococcus

Neisseria

وأنواع أخرى من Anaerobic bacteria

2- السائل المحيط بالرئة :

M.tuberculosis
S.pneumonia
Coag.positive Staphylococcus
H.influenzae
Actinomyces (Fungi)

أنواع أخرى من Streptococcus

3- السائل المحيط بالقلب :

مجموعة Enterobacteriaceae
Staphylococcus
Streptococcus
S.pneumonia
Salmonella
Shigella
Neisseria

سائل البطن :

E.coli	Diphtheroids
S.pneumonia	Bacteroides Fragilis
S.Faecalis	Streptococcus(group A,B)
Klebsiella	Viridans streptococcus
S.aureu	C.perfringens
Coag .Negative Staphylococci	Micrococci
Candida	Pseudomonas
Proteus	Anaerobic bacteria

الجمع النقل Specimens Collection and Transport

يتم جمع سوائل الجسم بواسطة الطبيب المختص إلا أنه يجب تعقيم الجلد بشكل جيد قبل اخذ العينة باليود 2% والكحول 70% ثم إجراء عملية السحب Aspiration بواسطة إبرة معقمة حيث يفضل سحب حوالي 3-10 مليلتر من

السائل ثم وضع العينة في أنبوب يحتوي على مادة مانعة للتخثر مثل EDTA أو الهيارين أو SPS مع مراعاة ظروف التعقيم في كافة مراحل العمل. ويفضل التعامل مع سوائل الجسم بسرعة من حيث إجراء الفحوصات أو الزراعة لأنها تبقى صالحة للزراعة لمدة ساعتين على درجة حرارة الغرفة ويمكن أن تحفظ في الثلاجة وتنقل في صندوق مبرد Cooling box لمدة لا تزيد عن 24 ساعة ويفضل أيضاً نقل عينات سوائل الجسم في جو يحتوي على نسبة عالية من ثاني أكسيد الكربون أو نقلها لا هوائياً وخاصة عينة سوائل المفاصل .

الفحوصات المخبرية Lab . Examination:

يمكن إجراء عدة فحوصات مخبرية على سوائل الجسم للاستدلال من خلالها على الالتهاب أو على حالات مرضية أخرى تساعد الطبيب للوصول إلى التشخيص وإعطاء المناسب وأهم هذه الفحوصات التي تجري على سوائل الجسم هي:

1- الفحص الظاهري Appearance:

تكون سوائل الجسم في العادة صافية وشفافة إلا أن ظهور العكورة فيها قد يكون دليلاً على الالتهاب وقد تظهر كريات الدم الحمراء في السائل المحيط بالرئة في حالة الإصابة بالسل .

2- عدد كريات الدم البيضاء White blood cell count :

يمكن استخدام السائل المخروط مع مادة مانعة للتخثر من أجل عد كريات الدم البيضاء إذ أن وجود أكثر من 300 كرية دم بيضاء لكل مليلتر واحد من السائل ذو دلالة مهمة على وجود الالتهاب ويمكن إجراء عملية العد التفريقي لكريات الدم البيضاء في مسحة smear مصبوعة من السائل من أجل الاستدلال على نوع الكائن المسبب إذ أن وجود كريات الدم البيضاء متعددة الانوية Polynuclear cells بشكل سائد في المسحة smear دليل على الالتهاب البكتيري أما وجود كريات الدم البيضاء اللمفية Lymphocytes بشكل سائد فهذا دليل على الالتهاب الفيروسي .

3- الفحوصات الكيميائية Chemical examination :

يمكن من خلال إجراء بعض الفحوصات الكيميائية على سوائل الجسم التعرف على وجود أو عدم وجود الالتهاب الجرثومي والجدول التالي يبين بعض الفحوصات الكيميائية ونتائجها الدالة على الالتهاب .

الفحص	النتيجة في حالة وجود الالتهاب
البروتين	أكثر من 3 g/dl
أنزيم LDH	يزداد
السكر	ينخفض خاصة في الإصابة البكتيرية
الكثافة النوعية specific gravity	أكثر من 1.018
Lactic acid	يزداد خاصة في التهاب المفاصل البكتيري

ويساعد الفحص الأخير Lactic acid في التمييز بين حالة الروماتيزم أو تآكل المفاصل وبين حالة الالتهاب البكتيري إذ يكون منخفضاً أو طبيعياً في حالات الروماتيزم وتآكل المفاصل .

4- الفحوصات الجرثومية Microbiological examination

يتم إجراء عملية الطرد المركزي لمدة 10 - 15 دقيقة على السائل الجسمي المأخوذ إذا كان صافياً غير متعكر ثم يؤخذ الراسب لإجراء الفحوصات الجرثومية أما إذا كان السائل عكراً فيتم إجراء الفحوصات عليه مباشرة وهي كما يلي .:

أ- صبغة غرام Gram stain :

يتم عمل مسحة smear وصبغها بصبغة غرام للتعرف على النوع البكتيري المسبب للالتهاب .

ب- التحضير الرطب Wet mount :

يمكن من خلال التحضير الرطب الكشف عن وجود الفطريات وكريات الدم البيضاء مباشرة في العينة .

ج- الزراعة Culturing .

1- يفضل زراعة عينة سوائل الجسم روتينياً على الأوساط التالية .:

- وسطين من Blood agar

- وسط Chocolate agar

- وسط سائل مثل Thioglycolate broth أو Cooked meat broth أو

Trypticase soy broth

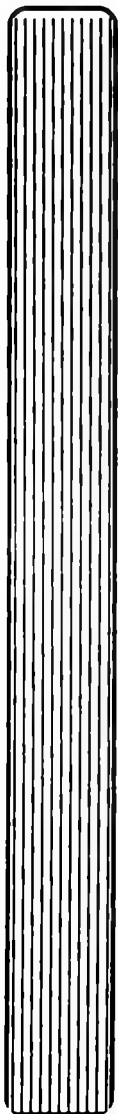
2- يحضن وسط Blood agar ووسط Chocolate agar في ظروف هوائية بوجود CO_2 5-10% على درجة حرارة 37 درجة مئوية ويراقب النمو لمدة 3-4 أيام قبل إعطاء النتيجة السلبية .

3- يحضن وسط Blood agar الثاني في ظروف لا هوائية ويتم مراقبة ظهور النمو لمدة أسبوعين .

4- في حالة عدم ظهور النمو على الأوساط الصلبة يتم عمل إعادة الزراعة Sub culture من الأوساط السائلة على أوساط صلبة جديدة حيث تستخدم الأوساط السائلة هنا لزيادة عدد البكتيريا التي قد تكون موجودة بأعداد قليلة في العينة أصلاً ويعتبر وسط Trypti case soy broth مفيداً في عزل مكورات السيلان gonococci في المفاصل أما وسط Cooked meat broth فهو من افضل أوساط تنمية الجراثيم اللاهوائية .

5- يمكن زراعة العينات وخاصة سوائل ما حول الرئة والقلب على وسط L.J.media للكشف عن بكتيريا السل أو على SDA لتنمية الفطريات الجهازية Systematic Fungi.

3



الوحدة الثالثة

الملاحق

الملحق (1)

فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية

Susceptibility test (Sensitive test)

يعتبر فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية (وهو قياس ملدي تأثير أنواع عدة من المضادات الحيوية على بكتيريا معينة) من الأمور المهمة والتي يجب إجراؤها دائماً بعد عزل الكائن المسبب للمرض، من أجل اختيار المضاد الحيوي الأنسب و الأفضل لعلاج الالتهابات. ونتيجة لتعدد أنواع المضادات الحيوية المصنعة وبسبب ظهور سلالات جرثومية مقاومة لبعض أنواع المضادات الحيوية اللجوء إلى إجراء هذا الفحص من اجل مساعدة الطبيب في اختيار العلاج المناسب ودراسة إنتشار السلالات الجرثومية المقاومة للمضادات الحيوية وخاصة الأنواع المهمة والمؤثرة في صحة المجتمع .

ويتم اجراء فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية بشكل عام بطريقتين هما :

1-طريقة التخفيف Dilution method .

والتي تعتمد بشكل مختصر على تحضير تخافيف متدرجة تصاعدياً من المضاد الحيوي ثم حقنها بمعلق قياسي (معياري) Standard suspension من البكتيريا المراد اجراء الفحص عليها ليتم مراقبة تأثير المضاد الحيوي على البكتيريا من خلال تثبيط أو قتل النمو البكتيري . وبالرغم من أن هذه الطريقة تعتبر أكثر حساسية ودقة من غيرها إذ يمكن من خلالها مباشرة إيجاد الحد الأدنى للتركيز المثبط (MIC)

إلا أنها غير شائعة الاستخدام وذلك لأنها تحتاج إلى وقت طويل وكمية كبيرة من المواد لاجرائها .

وتتم عملية التخفيف هنا بطريقتين :

أ-طريقة الانابيب Broth tube dilution .

حيث يتم أخذ كمية محددة من المضاد الحيوي المراد استخدامه ثم عمل تخفيف متدرجة تصاعدياً في أنابيب تحتوي على وسط غذائي سائل وبعد ذلك يتم حقن كمية محددة من المعلق البكتيري القياسي المخضر للبكتيريا المراد إجراء الفحص عليها في كل انبوب .

وبعد فترة الحضانة التي تتراوح من 18-24 ساعة يتم مراقبة وجود النمو في الانابيب من خلال ظهور العكورة أو اختفائها ليتم من خلال هذه الطريقة تحديد أقل تركيز للمضاد الحيوي الذي أدى إلى إيقاف النمو البكتيري .

ب-طريقة الأجار Agar plate dilution .

تشابه هذه الطريقة طريقة الانابيب السابقة ولكن يستخدم هنا وسط صلب وهو في العادة وسط Mueller-Hinton agar. ويتم إجراء الفحص بالطريقة التالية .:

-تحضير عدة تخفيف للمضاد الحيوي في أنابيب اختبار منفصلة .

-تحضير وسط M.H agar ووضعة في الحمام المائي على درجة 50 درجة مئوية ليعقى ذائباً

-مزج حجم محدد من كل تخفيف مع حجم محدد من الوسط جيداً في طبق منفصل ثم تركها لتتصلب .

-حقن كل وسط بحجم محدد من المعلق البكتيري القياسي بحيث ينشر المعلق على سطح الوسط بشكل كامل ومتساوي .

-حضن الأوساط على درجة 37 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة .

-مراقبة ظهور النمو وتحديد أقل تركيز أدى إلى عدم ظهور النمو البكتيري .

ملاحظة..

يقارن المعلق البكتيري المعياري المناسب لإجراء الفحص بما يعادل نصف (0.5) من تركيز محلول MC-farland القياسي (المعياري) ويحضر محلول MC-farland المعياري من:

- 99.5 مليلتر من 1% من حامض الكبريتيك Sulfic acid.

- 0.5 مليلتر من 1.175% من كلوريد الباريوم Barium chlorid والذي يعطي محلول سلفات الباريوم Barium sulfate ذو الكثافة الضوئية المحددة Obtical density ويعتبر المعلق البكتيري المحتوي على 1.5×10^{18} خلية بكتيرية لكل مليلتر واحد مساوياً لنصف تركيز محلول MC-farland المعياري .

2- طريقة قرص الانتشار Disk diffusion method .

تعتبر هذه الطريقة الأكثر إنتشاراً وشيوعاً من سابقاتها في المختبرات لسهولة وسرعة اجرائها وقلة تكلفتها وهي ما تسمى بطريقة Kirby-Bauer، والتي تعتمد في نتيجتها على قياس حلقة التحلل أو تثبيط النمو حول قرص المضاد الحيوي على الوسط الصلب إذ يتم من خلال ذلك تحديد نوع المضاد الحيوي الأنسب و الأكثر فعالية للجرثومة المستخدمة في الفحص . وتتم هذه الطريقة كما يأتي:

1- بواسطة حلقة معدنية يتم أخذ جزء من النمو البكتيري وحقنة في أنبوب يحتوي على 5 مليلتر من وسط سائل ثم حضن الوسط على درجة حرارة 35 درجة مئوية لمدة 4 ساعات أو أكثر حتي يظهر النمو على شكل عكورة في الوسط ثم تقارن العكورة مع محلول MC-farland المعياري حيث يجب أن يعادل تركيز النمو مقدار نصف تركيز محلول MC-farland المعياري .

2- يتم أخذ جزء من الوسط السائل بواسطة ماسحة قطنية معقمة ويفرد بشكل متساوي على الوسط الصلب وهو وسط Mueller Hinton agar.

3- بواسطة ملقط معدني معقم يتم وضع عدة أقراص لعدة أنواع من المضادات الحيوية (8-12 قرص) على سطح الوسط الزراعي الصلب مع ترك مسافات

مناسبة بين كل قرص وآخر . إذ يفضل وضع الأقراص على الوسط الصلب خلال مدة زمنية لا تتجاوز 15 دقيقة بعد النمو عليه حتى لا تتكاثر البكتيريا وتقلل من فعالية المضاد الحيوي .

4- يتم حقن الطبق على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة ثم قراءة النتيجة وملاحظة التحلل حول أقراص المضادات الحيوية .

وتعتمد فعالية طريقة قرص الانتشار على عدة عوامل هي:

- 1- نوع وتركيز المضاد الحيوي في القرص المستخدم .
- 2- مدى صلاحية وطريقة حفظ أقراص المضادات الحيوية المستخدمة إذ أن بعضها مثل أقراص مجموعة السيفالوسبورين يجب أن تحفظ بدرجة حرارة أقل من 14 درجة مئوية . ويمكن أن تبقى صالحةً تحت الاستخدام في الثلاجة لمدة أسبوع واحد بينما الأنواع الأخرى مثل مجموعة البنسلينات فهي تحفظ مبردة على درجة حرارة 4-5 درجات مئوية
- 3- نوع وعمر الوسط المستخدم وعمق الاحار فيه : ويعتبر وسط M.H. agar هو أكثر وأفضل الأوساط استخداماً وشيوعاً في هذه العملية إذ يفضل أن يكون بعمق حوالي 4ملم ويتم استخدامه في فترة لا تتجاوز الأسبوع من إعداده .
- 4- نوع وعدد البكتيريا المستخدمة : يجب مطابقتها بكثافة محلول MC-farland المعياري لتعطي نتائج سليمة ودقيقة .
- 5- درجة حرارة ومدة الحضانة : تخزن الأطباق عادة على درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة 18-24 ساعة .
- 6- معدل نمو البكتيريا وحساسيتها للمضاد الحيوي .
- 7- درجة ذائبية المضاد الحيوي وانتشاره على سطح الوسط الصلب .

ملاحظات،

- 1- يفضل استخدام طريقة التخفيف للبكتيريا بطيئة النمو حيث لا تعطى طريقة قرص الانتشار نتائج دقيقة ومعتمدة .

2- عند اجراء فحص الحساسية لبكتيريا Streptococcus أو بكتيريا Pneumonia يجب إضافة كمية من الدم الى الوسط للمساعدة في نمو هذه الأنواع . أما عند إجراء هذا الفحص لبكتيريا Haemophilus فيجب إضافة 1% هيموجلوبين للوسط أو اجراء الفحص على وسط Chocolate agar .

3- يتم قراءة نتيجة الفحص لقياس قطر حلقة التحلل حول قرص المضاد الحيوي بالملليمتر Millimeter.

4- لا يمكن الحكم على فعالية المضاد الحيوي تجاه البكتيريا من خلال ظهور حلقة التحلل فقط وإنما يجب ان تكون حلقة التحلل أكبر من قطر معين خاص بنوع المضاد وتركيزه في القرص ويكون ذلك كما في الجدول التالي مثلاً:

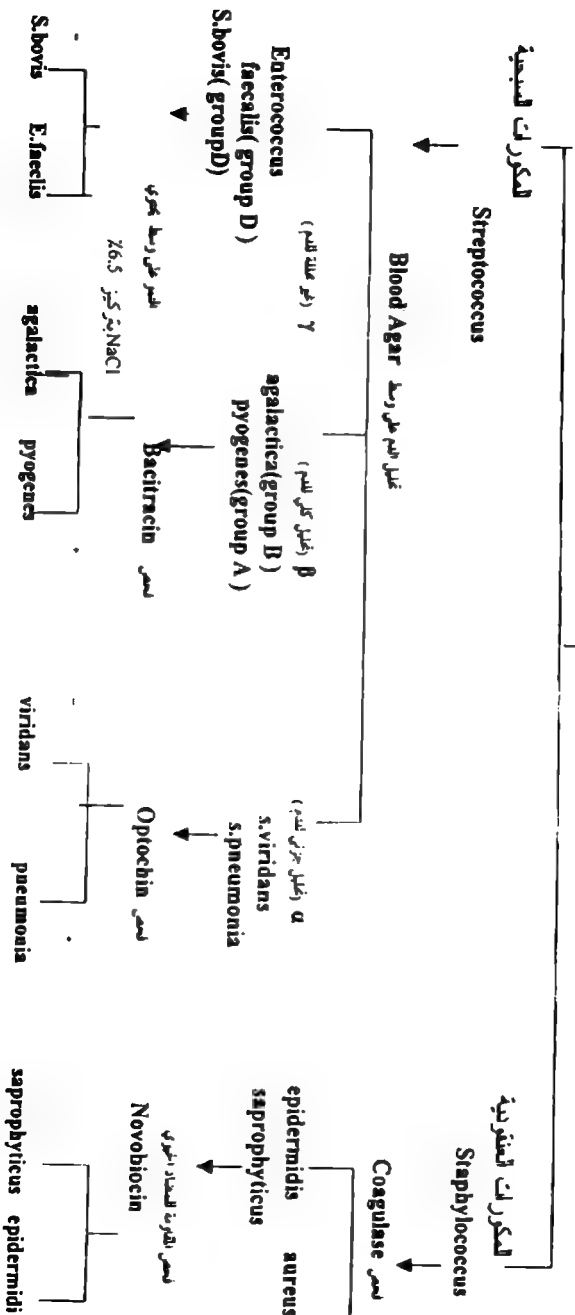
المضاد الحيوي	تركيز المضاد في القرص	قطر حلقة التحلل بالملليمتر	
		المقاومة Resistant	الحساسية Sensitive
Ampicillin	10 mg	أقل من 11	12 أو أكثر
Novobiocin	30 mg	أقل من 17	18 أو أكثر
Gentamycin	10 mg	أقل من 12	13 أو أكثر
Erythromycin	15 mg	أقل من 13	14 أو أكثر
Bacitracin	10 mg	أقل من 8	9 أو أكثر
Penicillin G	10 mg	أقل من 20	21 أو أكثر

المالحق (2)

أهم الأوساط المستخدمة في تنمية البكتيريا:

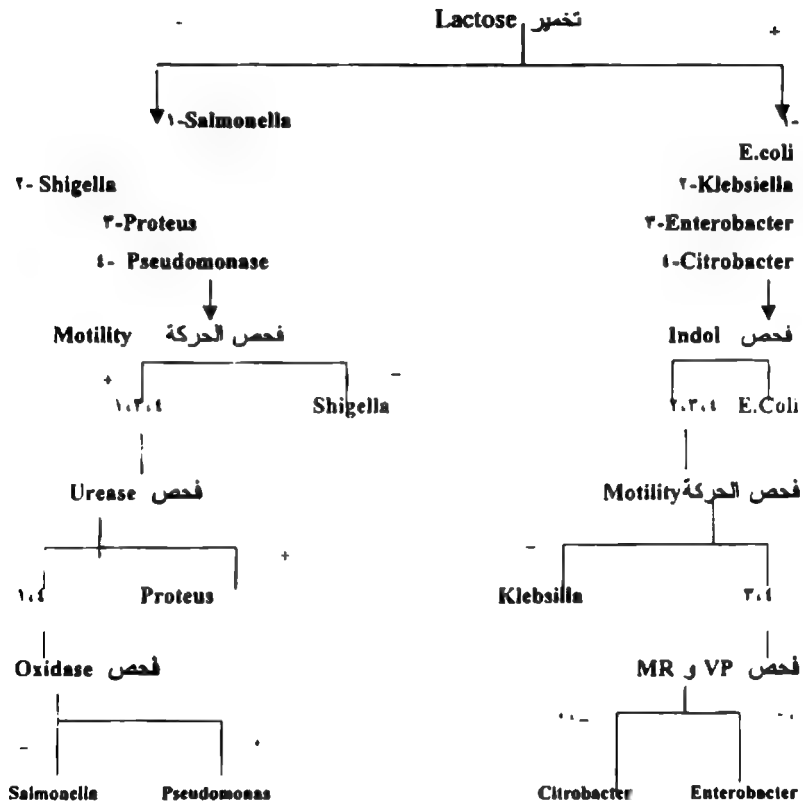
الوسط	نوعه	استخدامه
Blood agar	غني ومفرق	تنمية معظم أنواع البكتيريا المهمة طبياً والتفریق بين المحللة وغير المحللة للدم .
Chocolate agar	غني	تنمية معظم أنواع البكتيريا التي تحتاج إلى ظروف غذائية خاصة مثل <i>Neisseria</i> و <i>Haemophilus</i> والأنواع اللاهوائية .
MacConkey agar	مفرق واختياري	تنمية البكتيريا السالبة لصبغة جرام والتفریق بين الأنواع المخمرة وغير المخمرة لللاكتوز .
Thioglycollate media	غني	تنمية وتكثير وحفظ معظم أنواع البكتيريا
Thayer-martin agar	غني واختياري	تنمية بكتيريا <i>Neisseria</i> .
Lowenstein-Jensen media	غني واختياري	تنمية بكتيريا السل .
S-S agar	غني ومفرق	تنمية وتفریق بكتيريا <i>Salmonella</i> عن <i>Shigella</i> .
Mueller -Hinton agar	بسيط	يستخدم لإجراء فحص حساسية البكتيريا للمضادات الحيوية .
TCBS	مفرق وغني	للتفریق بين أنواع بكتيريا الكوليرا .
Blood agar مع Colistin و Nalidixic acid	اختياري	تنمية البكتيريا الموجبة لصبغة جرام فقط .
Blood agar مع kanamycin و vancomycin	اختياري	تنمية البكتيريا اللاهوائية المصنوعة السالبة لصبغة جرام .
Charcoal Yeast extract agar	غني واختياري	تنمية بكتيريا <i>Legionella</i> .
Phenyle ethyl alcohol Blood agar	غني	تنمية الأنواع اللاهوائية والاختيائية الكروية الموجبة لصبغة جرام .

كازيباز



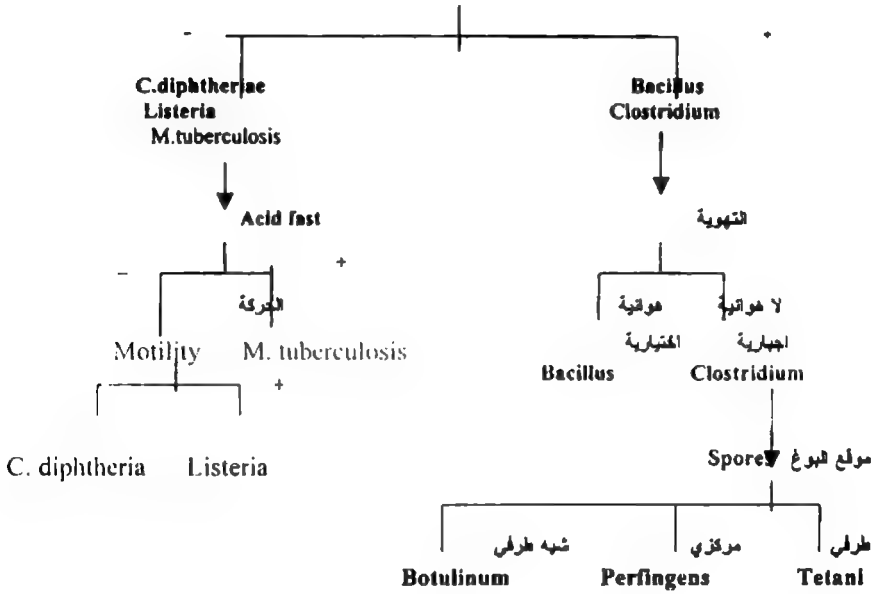
الملحق (4)

مخطط للتفريق بين أهم أنواع العصويات السالبة لصبغة غرام G-ve Rods



ملحق (5)

مخطط للتفريق بين أنواع البكتيريا العصوية الموجبة لصبغة غرام G+ve
Bacilli لتكون الأبواغ Spores (بواسطة صبغ الأبواغ)



ملحق (6)

المناطق الجسمية المعقمة وغير المعقمة (المحتوية على ساكن طبيعي Normal Flora) في الوضع الطبيعي:

مناطق الجسم غير المعقمة	مناطق الجسم المعقمة أصلاً Steril
تحتوي المناطق التالية في الأشخاص السليمين على عدد قليل من البكتيريا المرضية (Normal flora)	- الدم .
- القناة التنفسية	- السائل النخاعي الشوكي CSF.
- القناة الهضمية	- الأنسجة تحت الجلد Sub Cutaneous Tissue
- الجلد	- الأعضاء الداخلية مثل:
- الأذن	الكبد
- العين	الكلية
- القناة التناسلية البولية	القلب

ملحق (7)

جدول يوضح الأوساط الزراعية والفحوصات المخبرية اللازمة لكل عينة مرضية

الفحوصات المخبرية الأخرى التي تجرى على العينة مباشرة	الإسقاط الزراعية المستخدمة			
	إعلامية	الزرعية		
سمكت Smear سيولة وبسطة - سمكة زرم - زرد ظلي D.Fluorescence Ab	Bordet - gengen media boffers agar	B.A MacC Choc.A (CO ₂ %)	سمكت swabs من التوربينات و ظلم ظلي و ظلي - غسل swab للظلم و الظلم	ظلمت ظلمت ظلي ظلي UpperRTT
- لظلم Wet mount - سمكت Smear سيولة وبسطة سمكة زرم Acid Fastness مية	L.J.media SDA	B.A MacC Choc . A	- الظلم sputum - سراتل من المويصلات و القصبات توربية bronchoatearol fluid - الظلم حرك توربية pleural fluid - الظلم	ظلمت ظلمت ظلي ظلي LowerRTT
لظلم Wet mount سمكت صمغولة وبسطة سمكة زرم Dark Field Tech. حلبة الظلم الظلم	SDA Tblo Choc	B.A MacC CLEED	حليل	ظلمت قبة توربية (UTT)
لظلم Wet mount سمكة صمغولة وبسطة سمكة زرم Dark Field Tech. حلبة الظلم الظلم	SDA Tblo	B.A MacC Choc.A	حزوت الرعم و الاظلم و التوربينات حليل	ظلمت قبة صمغولة (GTT)

		ChocA (COR 7%)		
تغير رقم مادة رقم	Thio SDA	B.A MacC; Choc.A (COR 7%)	مستنت من البرزات اللون المحرمة سجل اللون السطحي	Ear Infection

تغير بعض الاختبارات المعروفة في الجدول التالي :

B.A : Blood Agar

MacC : MacConkey Agar

Choc.A : Chocolate Agar

SDA : Saburand Dextrose Agar

L.J media : Lewenstein - Jensen media

Tabo : Thioglycollate broth

HK : Hekton enteric agar

Campy BAP : Campylobacter media

المراجع

المراجع العربية:

- 1- الأحياء الدقيقة، د نجم الدين الشرايبي وزميله، جامعة دمشق/ سوريا 1980.
- 2- أساسيات علم الأحياء الدقيقة، ابراهيم الطيار وزميله، دار الكندي / اربد 2001
- 3- مدخل إلى علم الأحياء الدقيقة، ترجمة دخضر داوود سليمان وآخرون جامعة الموصل / العراق 1984
- 4- تجارب مختارة في الأحياء المجهرية، أمين عبد الجبار وزميله، جامعة البصرة / العراق 1987 .
- 5- الأحياء المجهرية الطبية، د مهدي السماك الهيئة العامة للتعليم والتدريب الصحي / العراق 1983
- 6- الكتاب العلمي في أساسيات علم البكتيريا، د هديل توفيق الحديشي جامعة البصرة / العراق 1983
- 7- علم الطفيليات الطبي، ابراهيم علي الطيار وآخرون دار الكندي / اربد 2002.

1-Bailey and scotts

Diagnostic Microbiology

Sydney M.Finegald,William J.Martin

6 th Ed 1982 mosby USA

2-Specimen collection and transport For Microbiological investigation

WHO 1995

3-Jawetz,Melnick and adelbergs

Medical Microbiology

20 th Ed 1995

4-Gabriel Virella

Microbiology and infectious diseases

3 rd Ed 1991 MASS Co.EGYPT

5-Davise H.Larone

Medically important Fungi

USA wasington ,D.C 1987

6-Elmer W.K.,stephen D.A.,William M.J

color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology

4th Ed philadelphia 1992

7-Beverly price Gobet

Diagnostic Microbiology (Lab .Mannal)

1998 USA

8- Stokes E.Jaon

Clinical Microbiology

6 th Ed 1987 Lonon

9- Miller,J.Michael

aguide to specimen management in clinical Microbiology

1996 USA

- 10- John crocker , Daivd Burnett
The science of Laboratory Diagnosis
1998 oxford UK
- 11- Kathleen D.pagana ,Timothy J.Pagana
Manual of Diagnostic and Labortory Test
1998 mosby .Londan
- 12- MacFarlane Wallace
Clinical oral Microbiology
1989 London .
- 13- Saul Neidemas ,Allen I.Jaskin
Advances in Applied Microbiology
USA 1997 .
- 14-Monica cheebrough
Medical Lab .Manual For Tropical countries
Fakenham co. Uk 1993 .
- 15-Delaat ,Adrian MC
Microbiology For the allied health Professions
USA 1984.
- 16-Jean J.L.,Karen M.R.
Clinical Labortory Science
4th Ed Mosby ,Inc 1999.
- 17- Maurice King
Amedical Lab .For Developing Countries
Fletcher and son Ltd –UK 1984.
- 18-Monica cheebrough ,John Mcarthur
Alab .Manual For Rural Tropical Hospitals
Longman G.Ltd london 1980.
- 19-Manual of basic techniques for ahealth laboratory
WHO 1980 .

